



**UNIVERSIDAD MICHOACANA
DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO**



**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA**

**Glicerol Residual como Sustrato para la
Producción de Ácido Cítrico por *Aspergillus Niger*.**

TESIS presentada por:

I. Q. GEORGINA GUADALUPE MARTÍNEZ LÓPEZ

**A la División de Estudios de Posgrado de la Facultad
de Ingeniería Química como requisito parcial
para autorizar el desarrollo de la tesis para obtener el grado de:**

**MAESTRO EN CIENCIAS
EN
INGENIERÍA QUÍMICA**

Asesor: Dr. Agustín Jaime Castro Montoya,

Co – Asesor: Dr. Miguel Ángel Zamudio Jaramillo,

RESUMEN

Glicerol Residual como Sustrato para la Producción de Ácido Cítrico por *Aspergillus Niger*.

Por: **Georgina Guadalupe Martínez López**

Septiembre 2017

Maestra en Ciencias en Ingeniería Química

Dirigida por: Dr. Agustín Jaime Castro Montoya

Co-asesorada por: Dr. Miguel Ángel Zamudio Jaramillo

Entidad: Posgrado de la Facultad de Ingeniería Química

Con el incremento en el uso de biocombustibles como el biodiesel, se han generado grandes cantidades de glicerol, como subproducto principal en el proceso de producción de dicho bioenergético. Esto ha motivado la búsqueda de alternativas para su reutilización. Investigaciones han demostrado que el glicerol crudo derivado de biodiesel puede ser utilizado para formar múltiples productos con valor añadido.

El presente estudio se centra en el análisis de diferentes escenarios para el diseño del proceso de producción de ácido cítrico con glicerol residual como sustrato, mediante la fermentación sumergida utilizando *Aspergillus niger*. Para el análisis experimental de dicho proceso se consideran como variables independientes a: la cantidad de sustrato, nutrientes $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4, \text{KH}_2\text{PO}_4 \text{ y } \text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}]$, velocidad de agitación y duración de la fermentación. La etapa exploratoria se llevó a cabo utilizando un diseño experimental Plackett-Burman y para la etapa de optimización un diseño Compuesto Central. Los resultados obtenidos de DPB indicaron que $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KH_2PO_4 y $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ fueron los componentes más significativos que afectan la producción de ácido cítrico. La producción óptima de ácido cítrico obtenido por DCC fue de 0.135542 g/l con un consumo del 41.98% del glicerol residual hacia metabolitos no identificados.

Palabras claves: Ácido cítrico, glicerol residual, diseño Plackett-Burman, diseño Compuesto Central, *A. niger*.

ABSTRACT

Glycerol Raw as Substrate for the Production of Citric Acid by *Aspergillus Niger*.

By: **Georgina Guadalupe Martínez López**

September 2017

Master of Science in Chemical Engineering

Directed by: Dr. Agustín Jaime Castro Montoya

Co-directed by: Dr. Miguel Ángel Zamudio Jaramillo

Entity: Posgrado de la Facultad de Ingeniería Química

With the increase in the use of biofuels such as biodiesel, large amounts of glycerol have been generated as the main by-product in the production process of this bioenergetic. This has motivated the search for alternatives for its reuse. Research has shown that crude glycerol derived from biodiesel can be used to form multiple products with added value.

The present study focuses on the analysis of different scenarios for the design of the process of citric acid production with residual glycerol as substrate, by submerged fermentation using *Aspergillus niger*. For the experimental analysis of this process, the following variables are considered as independent: the amount of substrate, nutrients $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4, \text{KH}_2\text{PO}_4 \text{ and } \text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}]$, agitation speed and duration of fermentation. The exploratory stage was carried out using a Plackett-Burman experimental design and for the optimization stage a Central Compound design. The results obtained from DPB indicated that nutrients $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4, \text{KH}_2\text{PO}_4 \text{ and } \text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}]$ were the most significant factors that affecting the production of citric acid. The optimal citric acid production obtained by DCC was 0.135542 g/l with a consumption of 41.98% of residual glycerol towards unidentified metabolites.

Key words: Citric acid, glycerol raw, Plackett-Burman design, central composite design, *A. niger*.

DEDICATORIA

A mi mami, que siempre ha sabido llevarme por el buen camino con su ejemplo de lucha y perseverancia que me ha convertido en la mujer que soy ahora, mis hermanos que siempre me han apoyado en cada una de mis decisiones, mi padre que a su forma ha estado al pendiente; también a mis primillos que son como mis hermanitos, para que sepan que siempre se puede lograr lo que uno se propone. Mil gracias a todos los que han creído siempre en mí y que siguen conmigo en este camino llamado vida.

“Hablan mucho de la belleza de la certidumbre como si ignorasen la belleza sutil de la duda. Creer es muy monótono; la duda es apasionante”.

Oscar Wilde

ÍNDICE

RESUMEN	ii
ABSTRACT.....	iii
ÍNDICE DE TABLAS.....	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
NOMENCLATURA.....	viii
AGRADECIMIENTOS	ix
GLOSARIO	x
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Planteamiento del problema	5
1.2 Justificación	5
1.3 Hipótesis.....	6
1.4 Objetivos	6
Objetivo General	6
Objetivos Específicos	6
CAPÍTULO 2. MARCO TEÓRICO	7
2.1 Glicerol.	7
2.1.1 Tipos de Glicerina.....	8
2.1.2 Glicerol, subproducto de la producción de biodiesel.	11
2.1.3 Usos del Glicerol Crudo	13
2.1.4 Rutas al catabolismo aerobio del glicerol y su regulación.....	14
2.2 Ácido Cítrico	17
2.2.1 Propiedades fisicoquímicas	17
2.2.2 Producción	17

2.2.3 Aplicaciones Industriales.....	21
2.3 Aspergillus	23
2.3.1 Morfología	23
2.3.2 Características	24
2.3.3 Fermentación Líquida	25
2.3.4 Sustratos	26
2.3.5 Fuente de Nitrógeno	27
2.3.6 Fuente de Fosforo	27
2.3.7 Iones Metálicos	28
2.3.8 Temperatura	29
2.3.9 pH	30
2.3.10 Agitación	31
2.4 Antecedentes	32
CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA	33
3.1 Purificación del Sustrato.....	33
3.2 Caracterización del Sustrato	35
3.2.1 Determinación de pH	35
3.2.2 Determinación de Densidad.....	35
3.2.3 Caracterización Cromatográfica del Glicerol y Dextrosa	36
3.3 Microorganismo	36
3.3.1 Conservación y Proliferación de la Cepa	36
3.4 Fermentación	38
3.5 Análisis del Ácido Cítrico.....	38
3.5.1 Determinación de Biomasa (Peso Seco)	38
3.5.2 Determinación de pH	39

3.5.3 Determinación de Ácido Cítrico mediante el Método Marier & Boulet (1958).....	39
3.6 Determinación de los Rendimientos ($Y_{p/s}$).....	40
3.7 Análisis de la Información	41
CAPÍTULO 4. RESULTADOS	42
4.1 Purificación del Glicerol Residual	42
4.1.1 Glicerol Residual Proveniente de la Producción de Biodiesel a partir de Aceite de Coco	42
4.1.2 Glicerol Residual Proveniente de la Producción de Biodiesel a partir de Aceites Vegetales y Grasas Animales de Desecho.....	43
4.2 Proceso de Fermentación	48
4.2.1 Reproducción y Recolección de la Cepa.....	48
4.3 Glicerol Puro	51
4.3.1 Primer Diseño Plackett-Burman	51
4.3.2 Segundo Diseño Plackett-Burman	57
4.3.3 Crecimiento, Consumo y Producción de Ácido Cítrico con Glicerol Analítico	61
4.4 Glicerol Residual.....	64
4.4.1 Diseño Experimental de Compuesto Central	66
CONCLUSIONES	77
RECOMENDACIONES	78
BIBLIOGRAFÍA	79
APÉNDICES	85
Curva de Calibración para la Determinación de Dextrosa y Glicerol	85
Curva de Calibración para la Determinación de Ácido Cítrico	87

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1. Propiedades fisicoquímicas del glicerol.....	8
Tabla 2.2. Especificaciones de calidad para cada tipo de glicerina.....	10
Tabla 2.3. Propiedades físicas del ácido cítrico en solución y de forma anhidra.....	17
Tabla 2.4. Contenido de ácido cítrico en algunas frutas comunes.	18
Tabla 2.5. Estadísticas del comercio en México para el ácido cítrico.....	19
Tabla 2.6. Aplicaciones del ácido cítrico.	22
Tabla 2.7. Temperatura óptima de crecimiento de las cepas.	30
Tabla 2.8. Clasificación de los microorganismos según su pH.....	31
Tabla 2.9. Compilado de investigaciones donde sus resultados sugieren puntos relevantes para anteceder el trabajo a desarrollarse.	32
Tabla 3.1. Micronutrientes utilizados en los medios.	38
Tabla 4.1. Resumen de los componentes obtenidos de la purificación de la muestra proveniente del biodiesel a partir de aceite de coco, representados en porcentajes.....	43
Tabla 4.2. Ensayos de purificación del glicerol.....	45
Tabla 4.3. Resumen de los componentes obtenidos de la purificación de la muestra proveniente del biodiesel a partir de aceite vegetales y grasas animales de desecho, representados en porcentajes.	47
Tabla 4.4. Densidad y concentración de las muestras en cada una de las etapas de purificación.	48
Tabla 4.5. Parámetros fijos del medio de fermentación.	50
Tabla 4.6. Rangos de condiciones de operación y nutrientes para la formulación de los tratamientos.	50
Tabla 4.7. Matriz del diseño experimental Plackett - Burman 7/8, primer estudio exploratorio.	52
Tabla 4.8. Respuestas del Diseño Experimental Plackett - Burman 7/8 del primer estudio exploratorio.	53

Tabla 4.9. Estimación de los efectos sobre las respuestas ácido cítrico, fracción de consumo de glicerol y rendimiento producto-sustrato del diseño experimental Plackett - Burman 7/8, primer estudio exploratorio.	54
Tabla 4.10. Reformulación de los límites de evaluación de los factores del diseño experimental Plackett – Burman 7/8 del primer estudio exploratorio.	55
Tabla 4.11. Respuestas del Diseño Experimental Plackett - Burman 7/8 para el segundo estudio exploratorio.	57
Tabla 4.12. Estimación de los efectos sobre las respuestas ácido cítrico, fracción de consumo de glicerol y rendimiento producto-sustrato del diseño experimental Plackett - Burman 7/8, segundo estudio exploratorio.	58
Tabla 4.13. Rendimientos obtenidos con diferentes microorganismos.	61
Tabla 4.14. Ensayo preliminar de fermentación con muestra cruda.	65
Tabla 4.15. Diseño de Compuesto Central y sus Respuestas.	67
Tabla 4.16. ANOVA para el modelo cuadrático de superficie de respuesta.	68
Tabla 4.17. Deseabilidad Prevista y Observada de cada uno de los tratamientos.	73
Tabla 4.18. Optimización de la Deseabilidad.	74

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Ciclo del biodiesel.	1
Figura 1.2. Producción mundial de biodiesel del 2008 al 2015 en millones de toneladas.	2
Figura 1.3. Precios del glicerol alrededor del mundo (\$/Kg).....	2
Figura 1.4. Ejemplos de productos químicos producidos por fermentación microbiana de glicerol bruto. Los círculos / posiciones indican las condiciones de aerobiosidad en las que estos productos químicos pueden ser producidos por fermentación microbiana y los principales grupos productores microbianos.	4
Figura 2.1. Estructura química del glicerol.	7
Figura 2.2. Tipos de glicerina, nivel de pureza y aplicaciones.....	9
Figura 2.3. Reacción de transesterificación de un triglicérido para producir biodiesel. ..	11
Figura 2.4. Aspecto de diferentes corrientes de glicerol. A: glicerol puro; B: glicerol en bruto con pH a 12; C: glicerol en bruto después del pH ajustado a 7.0; D: glicerol en bruto después de que el pH se ajustó a 7.0 y la separación de fases por centrifugación.	12
Figura 2.5. Principales rutas del metabolismo aeróbico del glicerol.	16
Figura 2.6. Mercados importadores de México.	20
Figura 2.7. Mercados proveedores de ácido cítrico a México.	21
Figura 2.8. Morfología de <i>Aspergillus niger</i>	24
Figura 3.1. Formación de ácidos grasos libres a partir de la reacción de los jabones con HCl.	33
Figura 3.2. Proceso de purificación de la glicerina.	34
Figura 3.3. Coloración adquirida de la curva de calibración de ácido cítrico.	40
Figura 4.1. a) Separación de la fase orgánica de la fase acuosa a un pH=6.2, b) Separación de la fase orgánica de la fase acuosa a un pH=3.0.	43
Figura 4.2. Imágenes de las principales etapas de eliminación de impurezas de la muestra cruda.	46
Figura 4.3. Complicaciones generadas en las variantes del proceso de purificación.	46
Figura 4.4. Placas inoculadas con <i>Aspergillus niger</i> en medio PDA.	49

Figura 4.5. Esporas visualizadas al realizar el conteo en la cámara de Neubauer a través del lente 40X de un microscopio.	49
Figura 4.6. Medios de cultivo del primer diseño Plackett-Burman al final de su tiempo de fermentación.	56
Figura 4.7. Medios de cultivo del segundo diseño Plackett-Burman al final de su tiempo de fermentación.	59
Figura 4.8. Comparativa entre la fracción de consumo de los dos diseños Plackett-Burman.....	60
Figura 4.9. Crecimiento de diferentes cepas en el mismo medio de cultivo.....	61
Figura 4.10. Curvas de Crecimiento, Consumo Producción de <i>A. niger</i>	62
Figura 4.11. Curva de producción de ácido cítrico.	63
Figura 4.12. Cinética presentada por Rywinska y Rymowicz (2009) <i>Y. Lipolytica Wrarislavia</i>	64
Figura 4.13. Crecimiento y morfología de <i>Aspergillus niger</i> durante el seguimiento de su cinética.	64
Figura 4.14. Diagrama de Pareto estandarizada para AC.....	70
Figura 4.15. Líneas de contorno de la superficie de respuesta estimada (Sulfato de Amonio contra Fosfato de Potasio). a) Ácido cítrico, b) Fracción de consumo de glicerol y c) Biomasa.	71
Figura 4.16. Gráfica de Superficie (a) y de contorno (b) de respuesta de la optimización de las múltiples respuestas.	75
Figura 4.17. Crecimiento de <i>A. niger</i> en los medios formulados por DCC.	76

NOMENCLATURA

AC	Ácido Cítrico
Frac	Fracción
HCl	Ácido Clorhídrico
H ₃ PO ₄	Ácido Fosfórico
H ₂ SO ₄	Ácido Sulfúrico
Cu	Cobre
DCC	Diseño Compuesto Central
DPB	Diseño Plackett-Burman
USD	Dólar Estadounidense
Ej	Ejemplo
EtOH	Etanol
FL	Fermentación Líquida
FCC	Food Chemicals Codex
g	Gramos
KOH	Hidróxido de Potasio
NaOH	Hidróxido de Sodio
Fe	Hierro
HPLC	High performance liquid chromatography
l	Litro
Mn	Manganeso
p	Peso
ton	Toneladas
USP	United States Pharmacopeia
v	Volumen
Zn	Zinc

AGRADECIMIENTOS

A mis padres y hermanos: por el apoyo brindado durante todo este proceso de nuevo aprendizaje, las palabras de aliento, llevar conmigo problemas y estar siempre a mí lado librando batallas.

A mis abuelitos, tías y primos: por estar dándome ánimos en cada momento, regalarme momentos de relajación a su lado, a Cris y Abril por ayudarme y desvelarse a mi lado.

A mis amigos: a todos los que estuvieron conmigo en el proceso de todo el proyecto, aguantando conmigo los momentos difíciles, haciéndome reír y hacerme llevadero todo el proceso de escritura.

A los compañeros del TEC: aquellos estuvieron conmigo largas horas en el laboratorio y que pudimos establecer buenos lazos, en especial a los doctores que me ayudaron compartiéndome sus conocimientos.

A los compañeros del PIQ: aquellos que estuvieron conmigo durante toda esta nueva etapa, grandes personas y excelentes amigos que la vida me puso enfrente.

A mi mesa de evaluación: a mi asesor, coasesor y sinodales que me fueron forjando dudas y soluciones para así fortalecer mi criterio, gracias a ustedes continuo la línea del conocimiento.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) que por medio del Posgrado de Ingeniería Química de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo me otorgaron la posibilidad de continuar con el aumento del conocimiento. Al Instituto Tecnológico de Morelia, pues gracias a sus instalaciones se hizo posible esta investigación.

GLOSARIO

Asexual	Que se produce sin intervención ajena a sí mismo.
Acroleína	Es un poderoso lacrimógeno. Se polimeriza fácilmente.
Amiláceos	Que contiene o se parece al almidón.
Anabolismo	Conjunto de procesos metabólicos en los cuales se produce la síntesis de moléculas a partir de otras más simples.
Anhidro	Que no contiene agua.
Biocombustibles	Mezcla de sustancias orgánicas que se utiliza como combustible.
Biodiesel	Tipo de Biocombustible.
Catabolismo	Fase del proceso del metabolismo en la cual se reducen elementos a otros más simples.
Combustión	Reacción química que se produce entre el oxígeno y un material oxidable, que va acompañada de desprendimiento de energía y habitualmente se manifiesta por incandescencia o llama.
Conidios	Es una espora asexual inmóvil formada directamente a partir de una hifa o célula conidiógena o esporógena.
Corrosión	Deterioro de un material a consecuencia de un ataque electroquímico por su entorno.
Detrimento	Daño de un material.
Digestión	proceso en el cual microorganismos descomponen material
Anaeróbica	biodegradable en ausencia de oxígeno.
Elongación	Alargamiento.
Eutrófico	Se dice del medio natural rico en componentes nutritivos, especialmente en sales minerales.
FCC	Food Chemicals Codex

Fermentación	Proceso bioquímico por el que una sustancia orgánica se transforma en otra, generalmente más simple, por la acción de un fermento.
Hialinas Septadas	Tejido transparente que divide de un modo completo o incompleto en estructuras en otras más pequeñas.
Hifas	Red de filamentos cilíndricos que conforman la estructura del cuerpo de los hongos multicelulares.
Metabolito	Sustancia producida durante el metabolismo.
Micelio	Aparato vegetativo de los hongos que le sirve para nutrirse y está constituido por hifas.
Oligoelementos	Bioelementos presentes en pequeñas cantidades en los seres vivos y tanto su ausencia como su exceso puede ser perjudicial para el organismo.
Saprófito	Organismos cuya alimentación consiste en ingerir sustancias orgánicas en estado de descomposición.
Taxonomía	Ordenación jerarquizada y sistemática de los grupos de animales y de vegetales.
Transesterificación	Proceso de intercambiar el grupo alcoxi de un alcohol.
Traza	Rastro de un componente.
Ubicuas	Presente a un mismo tiempo en todas partes.
USP	United States Pharmacopeia

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

El biodiesel es un combustible sustituto del gasoil, el cual normalmente es producido partiendo de materias primas agrícolas (aceites vegetales y/o animales) y alcohol (metanol/etanol), el cual, a su vez, puede ser producido a partir de residuos agrícolas. Donde se extraen sus aceites, los cuales son procesados para su refinamiento y por medio de una reacción de transesterificación se produce el biodiesel, sin embargo, a partir de este proceso se produce una gran cantidad de glicerina cruda como subproducto en un porcentaje aproximado del 10% (p/p) del total de la carga de aceite alimentada, lo que significa una gran cantidad de glicerina cuando la escala productiva aumenta, convirtiéndose en un problema de disposición de subproductos, muy a pesar de las numerosas aplicaciones industriales de estas (Acevedo & Hernández, 2015). El proceso evolutivo del ciclo del biodiesel se muestra en la Figura 1.1 a continuación.



Figura 1.1. Ciclo del biodiesel.

Actualmente, la producción de biodiesel está teniendo una rápida expansión, dando como resultado, que el mercado se inunde con exceso de glicerol crudo. La producción mundial de biodiesel en 2013 fue de 27.06 millones de ton y en 2014 fue de 29.12 millones, lo que se traduce en un incremento del 7.6%. Con respecto a 2008, la

producción mundial se ha incrementado en un 65% aunque a partir de ese año el crecimiento es más lento tal y como puede verse en la Figura 1.2.

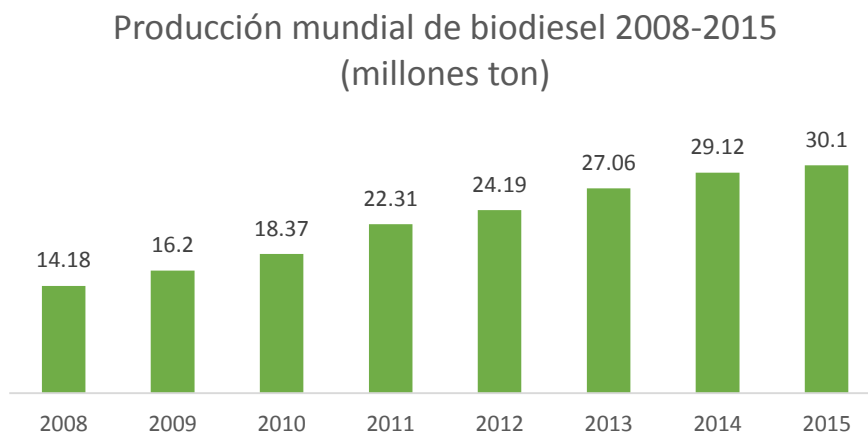


Figura 1.2. Producción mundial de biodiesel del 2008 al 2015 en millones de toneladas.

El incremento de glicerina cruda proveniente de la industria del biodiesel, ha impactado negativamente su mercado, desestabilizando el precio y disminuyendo la rentabilidad que podrían obtener los productores. Esta variación en cuanto a los precios del glicerol se puede observar en la Figura 1.3 en donde se pueden notar la oscilación del precio del glicerol a nivel mundial en el paso de los años.

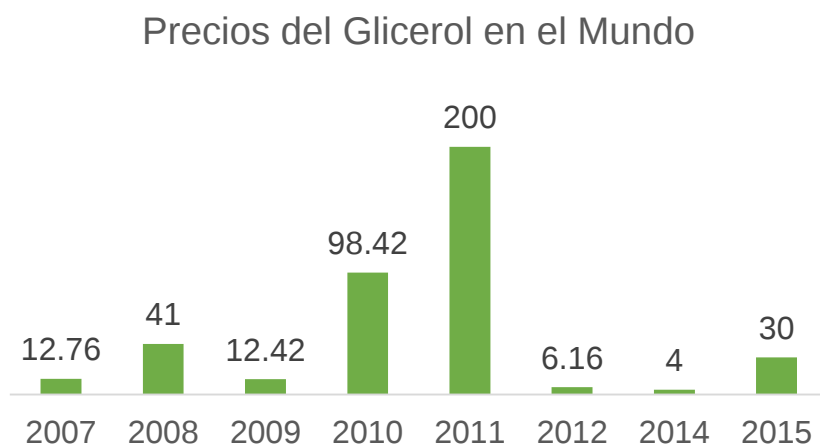


Figura 1.3. Precios del glicerol alrededor del mundo (\$/Kg).

La eliminación del glicerol por combustión requiere condiciones de alta temperatura, no fáciles de alcanzar, que aseguren la eliminación total de productos de alto carácter tóxico (ej. acroleína). La presencia de sales puede ser causa de problemas de corrosión en las boquillas de los quemadores. Además, las cenizas procedentes de la combustión (sales fundidas), principalmente potasio y sodio, se solidifican en los tubos de los equipos mecánicos de generación de vapor creando incrustaciones difíciles de limpiar. (UDELAR (s.f)).

La situación de la acumulación del crudo, no solo ha ocasionado un problema económico para las plantas de biodiesel sino también ambiental ya que en muchos casos el glicerol crudo ha sido vertido en cuerpos de agua (Gómez & Cancino, 2011).

Por lo anterior, el manejo del glicerol residual plantea problemas que inciden en el costo global del proceso de producción de biodiesel, debido a lo cual se ha renovado el interés por explorar nuevas alternativas para su procesamiento y/o disposición final. El impacto ambiental y los riesgos han de reenfocar el problema desde la perspectiva del ciclo de vida, así como de los métodos de proceso y producción, los que a su turno deberán encontrar acomodo dentro de las reglas que gobiernan el comercio internacional de los biocombustibles.

La glicerina cruda contiene un alto grado de impurezas por lo que no tiene un alto valor agregado, su purificación a glicerol USP es costosa debido al nivel de contaminantes contenido. Esto, da la oportunidad para hacer del glicerol, un bloque fundamental dentro de los intermediarios químicos con los procesos biotecnológicos, generando una menor huella ambiental, y desarrollando la glicerol-química. (Montoya & Aragón, 2010).

Varios métodos de eliminación y uso de este glicerol crudo se han intentado (digestión anaerobia, alimentos para animales, y que incluye la combustión, compostaje, conversiones termoquímicas/biológicas) para convertir éste subproducto a productos con valor agregado.

El glicerol había sido en gran medida descuidado como sustrato para fermentaciones microbianas, la principal razón había sido el alto costo del glicerol, sin embargo, se invirtió esta situación, y hoy en día el glicerol se está convirtiendo en el foco de los sustratos de fermentación a emplearse.

El exceso de glicerol residual puede utilizarse en procesos biotecnológicos para producir productos químicos de valor añadido para evitar la eliminación de desechos y aumentar la economía del proceso.

Los microorganismos son capaces de convertir el glicerol en una serie de metabolitos (Figura 1.4), con rendimientos similares a los obtenidos al utilizar azúcares como sustratos (Almeida, Fávaro & Quirino, 2012).

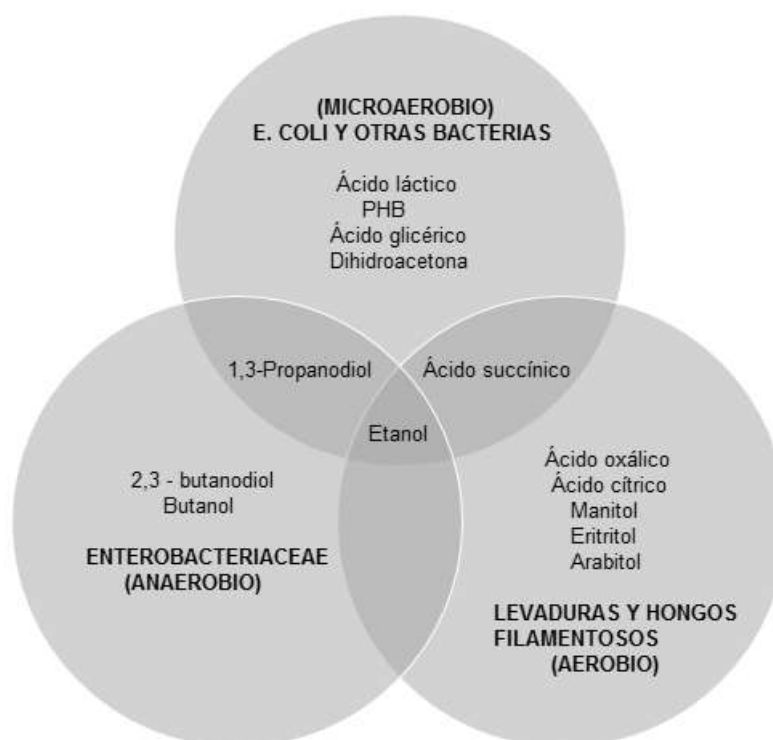


Figura 1.4. Ejemplos de productos químicos producidos por fermentación microbiana de glicerol bruto. Los círculos / posiciones indican las condiciones de aerobiosidad en las que estos productos químicos pueden ser producidos por fermentación microbiana y los principales grupos productores microbianos.

La capacidad de los microorganismos para aprovechar el glicerol crudo como una fuente de carbono depende de la composición del subproducto, ya que algunos de sus compuestos pueden actuar como inhibidores o como nutrientes (Gómez & Cancino, 2011).

1.1 Planteamiento del problema

Para satisfacer las necesidades de una fuente de energía renovable se produce biodiesel, un subproducto de esta energía es el glicerol, el cuál a razón de tener muchas impurezas es considerado residuo sin valor. Debido a la gran acumulación de glicerol se debe encontrar un método para convertirlo en un producto con valor agregado y así evitar un nuevo problema ambiental. ¿Es el glicerol un medio viable para obtener ácido cítrico como producto de un bioproceso?, ¿Bajo qué condiciones proporciona buenos resultados?

1.2 Justificación

Debido al incremento de la producción del biodiesel hay una acumulación de glicerol crudo proveniente de dicha industria. Éste crudo no tiene un trayecto fijo que seguir después de ser separado de biodiesel, a causa de su composición es considerado un residuo peligroso por lo que es necesario una purificación para así poder enviarse a una ruta consecuente; sin embargo, una nueva problemática se presenta, la separación de los componentes que lo hacen altamente impuro hacen demasiado costoso dicho proceso. La aglomeración del glicerol ha impactado negativamente su mercado, lo que causa una desestabilización del precio y que disminuya la rentabilidad que podrían obtener los productores del biodiesel. Esto, da la oportunidad para hacer del glicerol, un bloque fundamental para los procesos biotecnológicos, posicionándose como un intermediario químico que no solo da una solución para consumo de un residuo sino también para obtener un producto de valor agregado y disminuir la huella ambiental.

1.3 Hipótesis

El glicerol residual es un sustrato viable para la producción de ácido cítrico por medio de *Aspergillus niger* haciendo rentable el proceso.

1.4 Objetivos

Objetivo General

- Obtener ácido cítrico por medio de fermentación líquida con *Aspergillus niger* empleando glicerol residual como sustrato.

Objetivos Específicos

- Caracterizar al glicerol residual y determinar su acondicionamiento para su metabolización por *Aspergillus niger*.
- Determinar las condiciones de operación para obtener un mayor rendimiento de la producción de ácido cítrico.
- Determinar la composición del medio de fermentación que ofrezca una alta producción del ácido cítrico.
- Cuantificar el ácido cítrico producido en los medios de cultivo.

CAPÍTULO 2. MARCO TEÓRICO

2.1 Glicerol.

El glicerol es un trialcohol que posee dos grupos hidroxilo primarios y uno secundario (ver Figura 2.1), los cuales ofrecen diversas posibilidades de reacción y es debido a esto que se presenta la versatilidad en la misma. Es un compuesto químico básico obtenido principalmente como co-producto en la industria oleoquímica. Naturalmente constituye el 10% de los aceites vegetales y grasas animales siendo manipulado de éstos mediante la producción de ácidos grasos y jabón además de los procesos donde se emplean reacciones de transesterificación. Tradicionalmente el glicerol se obtenía como subproducto de la saponificación de las grasas en la industria oleoquímica. Sin embargo, con el desarrollo de la industria petroquímica, se empezó a sintetizar a partir de la hidroxilación del propileno. Por otra parte, es producido sintéticamente por procesos petroquímicos desde epiclorhidrina, a partir del propileno (Cardona, Posada & Quintero, 2010). En la actualidad, con el auge en la producción de biodiesel, el mercado está saturado de glicerol crudo.

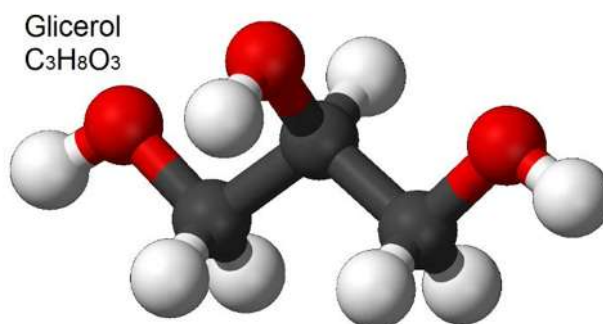


Figura 2.1. Estructura química del glicerol.

Es una de las sustancias más versátiles gracias a su combinación de propiedades físicas como químicas que son manipuladas para diversos productos gracias a su estabilidad y compatibilidad con otros productos (La Tabla 2.1 presenta algunas de las propiedades fisicoquímicas del glicerol). La glicerina se emplea ya sea como ingrediente o mediante su transformación para productos cosméticos, cuidado personal, así como

también para productos alimenticios y medicamentos. El glicerol tiene una amplia gama de aplicaciones industriales como: humectante, plastificante, emoliente, espesante, disolvente, medio de dispersión, lubricante, edulcorante y anticongelante, aditivo o material crudo en la industria farmacéutica y también es usado en la industria de explosivos.

Tabla 2.1. Propiedades fisicoquímicas del glicerol.

Punto de ebullición (se descompone)	290°C
Punto de fusión	18-20°C
Densidad relativa (agua = 1)	1.261
Solubilidad en agua	Muy buena
Presión de vapor, Pa a 20°C	<0.1
Densidad relativa de vapor (aire = 1)	3.17
Punto de inflamación	160°C
Temperatura de autoignición	400°C
Volumen en el aire	0.9-?
Peso Molecular	92.1 g mol ⁻¹
Apariencia	Incoloro a marrón
Olor	Inodoro a suave

2.1.1 Tipos de Glicerina.

Los grados comerciales de la glicerina para satisfacer los requisitos de la sociedad se presentan como: glicerina cruda, glicerina grado técnico y glicerina refinada.

Glicerina Cruda (~80%). Es subproducto de la reacción de transesterificación de las grasas animales y aceites vegetales a biodiesel. Este tipo de glicerina tiene una gran cantidad de contaminantes como lo son: metanol (de acuerdo al alcohol empleado en la conversión a biodiesel), agua, jabones y sales. Normalmente tiene un contenido de entre 40 y 88% de glicerol.

Glicerina Grado Técnico (>97%). Es producto de la purificación en donde han sido removidos la mayoría de sus contaminantes (metanol, jabones, sales y otra materia extraña). Se encuentra disponible en el mercado.

Glicerina Refinada (Grado USP o FCC, >99.7%). Es un producto de calidad farmacéutica, empleada en productos de consumo como alimentos, fármacos, cosméticos y productos de cuidado personal, así como en otras aplicaciones especiales. Deben cumplir con las estrictas especificaciones de la United States Pharmacopeia (USP) y el Food Chemicals Codex); cuando la glicerina es utilizada en productos de consumo debe contener calidad y pureza debido a la importancia que esto conlleva para el consumidor, entonces, el fabricante de estos productos de consumo especificará mediante los grados USP y FCC la calidad de la materia prima refinada frente a la calidad técnica para garantizar el producto ante sus clientes. Las empresas se ven sometidas a un proceso de regulación a sus instalaciones (núcleo del proceso de fabricación), métodos de pruebas, inspección, almacenamiento y distribución. La Figura 2.2 muestra los 3 diferentes tipos de glicerina existentes, así como sus aplicaciones y su nivel de pureza que contiene cada una de ellas (Cardona, et. al., 2010).

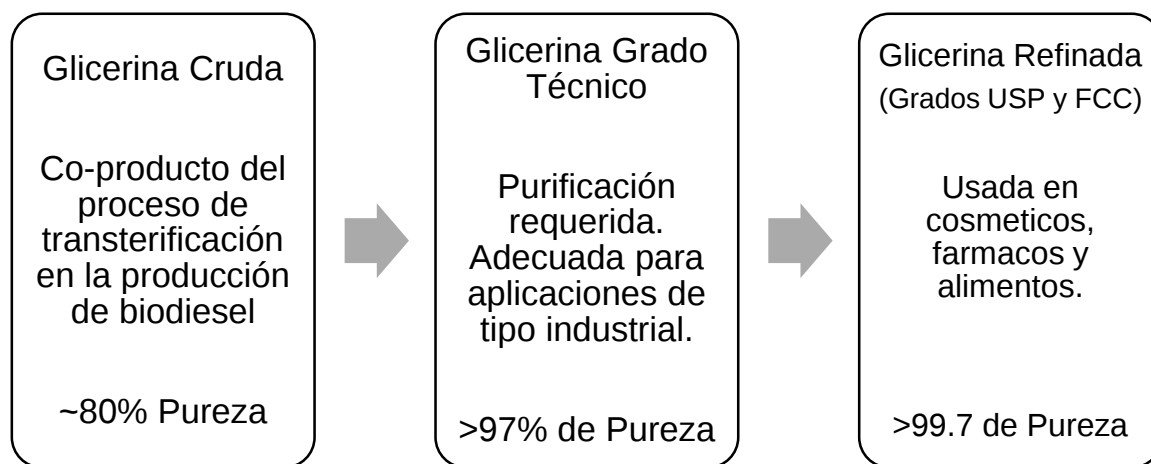


Figura 2.2. Tipos de glicerina, nivel de pureza y aplicaciones.

La Tabla 2.2 presenta algunas de las especificaciones de calidad y los rangos de contaminantes presentes en cada uno de los tipos de glicerina existentes (Cardona, et. al., 2010).

Tabla 2.2. Especificaciones de calidad para cada tipo de glicerina.

Propiedades	Glicerina Cruda	Glicerina Grado Técnico	Glicerina Refinada Grado USP (99.7%)
Contenido de Glicerol	40-88%	98% mín	99.7%
Ceniza	2% máx	N/A	N/A
Contenido de Humedad	N/A	2% máx	0.3% máx
Cloruros	N/A	10 ppm máx	10 ppm máx
Color	N/A	40 máx (Pt – Co)	10 máx (APHA)
Gravedad Específica	N/A	1.262 (a 25°C)	1.2612 mín
Sulfato	N/A	N/A	20 ppm máx
Análisis	N/A	N/A	99 – 101% (base seca)
Metales Pesados	N/A	5 ppm máx	5 ppm máx
Componentes Clorados	N/A	30 ppm máx	30 ppm máx
Residuos de Ignición	N/A	N/A	100 ppm máx
Ácidos Grasos y Ésteres	N/A	1 máx	1000 máx
Agua	12% máx	5% máx	0.5% máx
pH (solución 10%)	4 – 9	4 – 9.1	N/A
Residuos Orgánicos	2% máx	2% máx	N/A

N/A: No aplica

2.1.2 Glicerol, subproducto de la producción de biodiesel.

La composición de la glicerina cruda depende directamente de la materia prima utilizada y de las condiciones de operación del proceso de producción del biodiesel. En general, el glicerol constituye hasta 60% a 85% (p/p) de la corriente cruda (Wen, Pyle & Athalye, 2009).

Las diferentes grasas y aceites empleados para obtener el biodiesel presentan grandes diferencias de acuerdo a su composición química, cada una de ellas contiene un esqueleto de tres carbonos y cada uno de estos carbonos tiene acoplada una cadena de ácidos grasos; dichas cadenas son las que reaccionan con alcohol (usualmente metanol) para obtener el biodiesel. Se ha encontrado que la semilla de mostaza generó un nivel más bajo de glicerol (62%), mientras que el aceite de soja tenía 67.8% de glicerol y el aceite vegetal residual tenía el nivel más alto (76.6%) de glicerol (Wen, et. al., 2009). El metanol, los ácidos grasos libres y los jabones son las principales impurezas contenidas en el glicerol bruto. El metanol se debe a que en la producción de biodiesel se utiliza un exceso de metanol para impulsar la transesterificación química y no se recupera todo el metanol, la reacción para la producción de biodiesel se ve representada por la Figura 2.3. Los jabones, que son solubles en la capa de glicerol, se originan a partir de una reacción entre los ácidos grasos libres presentes en la materia prima inicial y el catalizador (base, por lo regular NaOH o KOH).

Además del metanol y los jabones, el glicerol crudo también contiene una variedad de elementos tales como calcio, magnesio, fósforo o azufre.

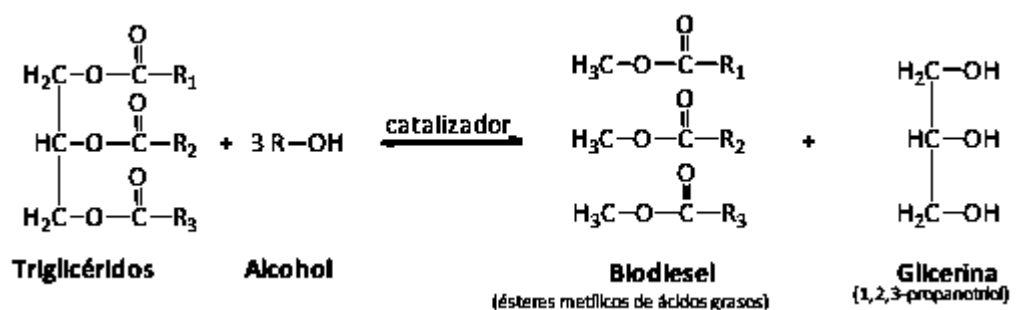


Figura 2.3. Reacción de transesterificación de un triglicérido para producir biodiesel.

El glicerol bruto derivado de la transesterificación catalizada por álcali tiene habitualmente un color marrón oscuro con un alto pH (11-12). Cuando se usa en fermentaciones microbianas, el glicerol en bruto se disuelve en la solución de medio y el pH normalmente se ajusta a un intervalo neutro. Los aspectos que normalmente se visualizan en estas etapas de acidificación del glicerol se representan en la Figura 2.4 a continuación (Wen et. al., 2009).

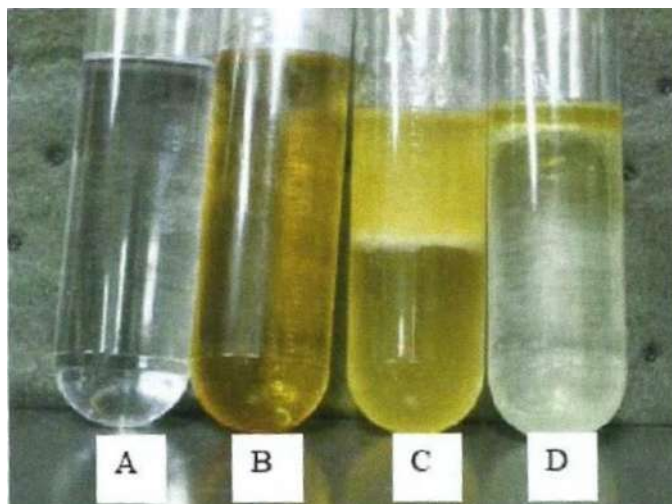


Figura 2.4. Aspecto de diferentes corrientes de glicerol. A: glicerol puro; B: glicerol en bruto con pH a 12; C: glicerol en bruto después del pH ajustado a 7.0; D: glicerol en bruto después de que el pH se ajustó a 7.0 y la separación de fases por centrifugación.

El contenido de carbono en la glicerina obtenida a partir de aceites vegetales de desecho es un 50% más alto que el obtenido en la media para los aceites de primer uso; esto probablemente se deba a la presencia de jabones, ésteres y glicéridos disueltos que no reaccionaron (Cardona et. al., 2010).

Para la purificación de la glicerina mediante un refinamiento químico primeramente se debe neutralizar el catalizador empleado debido a que éste suele acumularse en la fase de la glicerina y no en la del biodiesel (en este paso también se presenta la precipitación de sales). Los jabones producidos se remueven por coagulación y precipitación con cloruro férrico o sulfato de aluminio (para una mejor separación se centrifuga la muestra). Para este proceso es vital importancia mantener un control del pH

pues valores altos llevan a la polimerización del glicerol y valores bajos llevan a su deshidratación. Como última fase de la purificación la muestra se somete a un blanqueamiento empleando carbón activado o arcillas.

En un refinamiento físico como primera etapa se eliminan las grasas, sólidos y componentes insolubles por medio de una filtración y/o centrifugación (se puede requerir hacer ajustes del pH para dicha remoción). El agua empleada en los lavados es eliminada mediante evaporación. Por último, la muestra se somete a destilación con corriente de vapor y al final se realiza un blanqueamiento con carbón activo.

La purificación de la glicerina al 88% se diferencia de la glicerina al 95% y 98% en que en éstas últimas se les retira casi el doble de agua en la torre de destilación y para la glicerina al 98% la decantación se realiza a 5°C. Para la glicerina grado USP en la torre de destilación se aumenta la relación de reflujo y la relación de destilado-alimento para obtener una corriente de salida más rica; se emplea una resina de intercambio iónico para retirar un 95% de los triglicéridos que aún se encuentren presentes en la mezcla, con esto que obtiene un refinamiento que cumpla con los requerimientos de pureza.

2.1.3 Usos del Glicerol Crudo

Al ser un producto de desecho, sumado que es de alto costo su purificación para la industria de alimentos, farmacéutica o cosmética, se busca arduamente encontrar una forma alternativa de uso al glicerol. Para la transformación de la glicerina cruda hacia productos de valor agregado se han empleado métodos como los procesos de oxidación, la hidrogenólisis a glicoles, la eterificación a poligliceroles, la pirolisis y la gasificación hacia gases de síntesis, compostaje, digestión anaerobia, aditivo en alimentos para animales, conversiones termoquímicas, así como las rutas biotecnológicas.

Se ha informado de que el glicerol puede ser convertido termoquímicamente en propilenglicol, acetol o una variedad de otros productos.

Para las conversiones biológicas del glicerol bruto, sirve como alimentación en varios procesos de fermentación. Por ejemplo, se ha utilizado glicerol en la fermentación de *Anaerobiospirillum succinici producens* para la producción de ácido succínico. La fermentación de *E. coli* en glicerol conduce a la producción de una mezcla de etanol, succinato, acetato, lactato, e hidrógeno. El glicerol también se puede convertir en ácido cítrico por la levadura *Yarrowia lipolytica*, éste organismo produce la misma cantidad de ácido cítrico cuando se cultivan en glucosa o glicerol en bruto. Se ha encontrado también que las cepas mutantes de acetato de *Yarrowia lipolytica* pueden producir altos niveles de ácido cítrico, mientras que produce muy poco isocitrato. Además, se ha demostrado que el *Clostridium butyricum* puede utilizar glicerol derivado del biodiesel para producir 1,3-propanodiol (un componente químico importante con muchos usos industriales) en cultivos discontinuos y continuos. Durante el proceso de fermentación, el organismo también produce subproductos de ácido acético y butírico (Wen et. al., 2009).

El suministro de la glicerina cruda se mantuvo relativamente estable en el mercado hasta 2003 (Cardona et al., 2010); desde entonces casi se ha duplicado mientras que la demanda del producto ha permanecido sin cambios, por lo que, el exceso de oferta y la carencia en la demanda causan que los precios de la glicerina se mantengan muy bajos.

2.1.4 Rutas al catabolismo aerobio del glicerol y su regulación.

El primer paso de la asimilación de glicerol es su transporte desde el medio de fermentación hasta el interior de la célula. El transporte de glicerol tiene algunas características únicas que lo diferencian de los mecanismos de transporte de sustratos microbianos habituales (por ejemplo, azúcares) ya que puede atravesar las membranas biológicas por difusión pasiva, mientras que los azúcares no pueden. En hongos, opera un sistema de transporte activo, que usualmente se acopla a la absorción de protones (es decir, simport de protones). La difusión facilitada y los sistemas de transporte activo captan el glicerol dentro de las células microbianas, donde el glicerol entra en alguna vía catabólica.

Los microorganismos utilizan varias vías para transformar el glicerol en intermedios de la vía glicolítica. La vía más común es la vía de fosforilación, encontrada en la mayoría de los eucariotas y muchas bacterias. La siguiente es la vía oxidativa, principalmente distribuida entre las bacterias. Por último, tanto los hongos como las bacterias utilizan algunas otras vías menores, que son esencialmente variaciones de las dos vías principales. Debe indicarse, sin embargo, que más de una vía puede operar en un microorganismo. Sin embargo, todas las vías utilizadas están reguladas para asegurar una asimilación eficiente del glicerol (Fakas, Makri, Bellou & Aggelis, 2009).

El mecanismo regulador principal, empleado tanto por hongos como por bacterias, es la inducción por el sustrato de glicerol de las enzimas de la vía catabólica.

Cualquiera que sea la vía utilizada, el glicerol se transforma finalmente en intermedios de la vía glicolítica, como se representa en la Figura 2.5. Empleándose la segunda rama de la vía glicolítica para transformar estos intermedios en ácido pirúvico y desde allí en acetil-CoA.

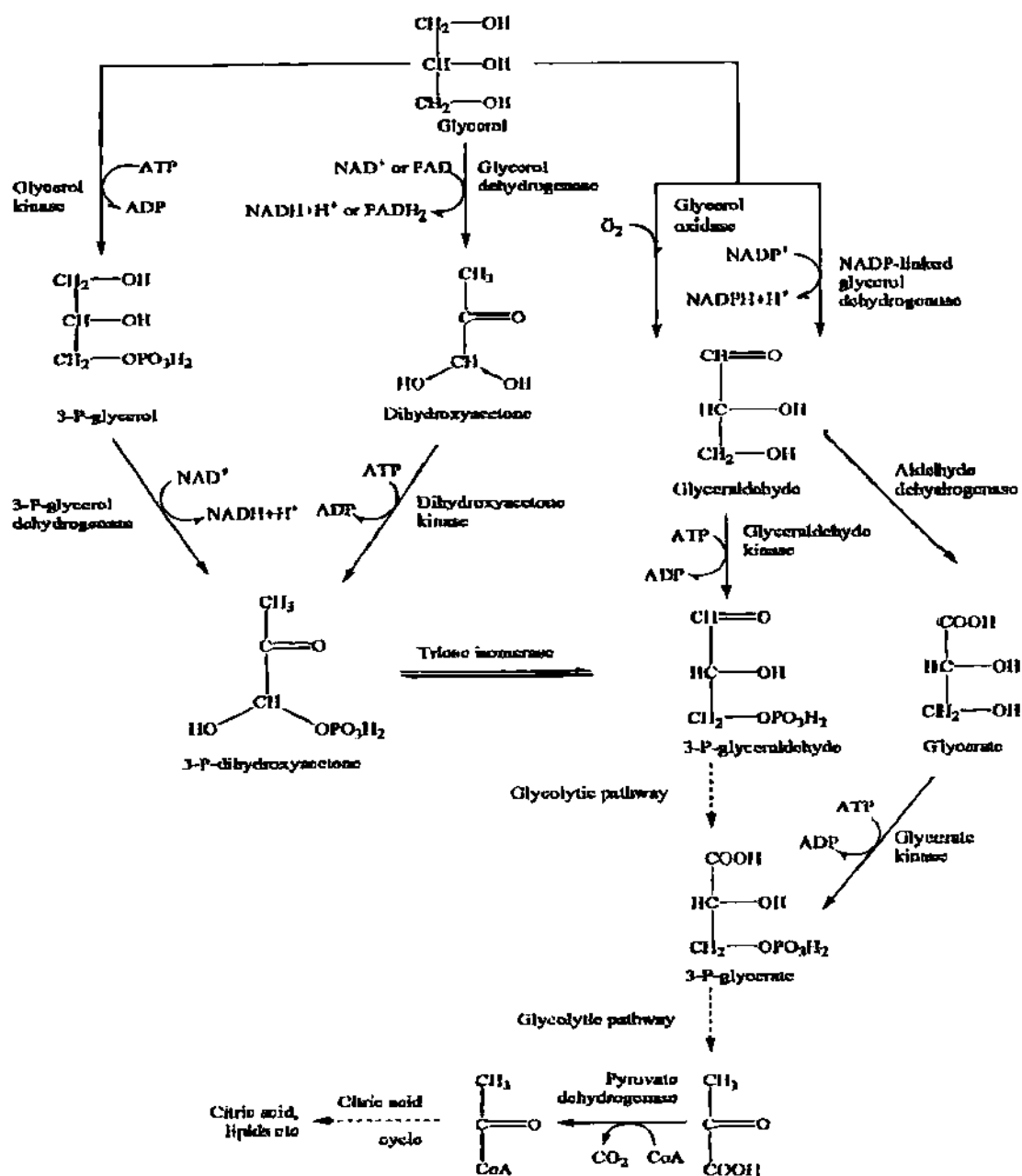


Figura 2.5. Principales rutas del metabolismo aeróbico del glicerol.

Los estudios sobre la regulación del catabolismo del glicerol en hongos son bastante escasos, y la mayoría de ellos se refieren a levaduras.

2.2 Ácido Cítrico

2.2.1 Propiedades fisicoquímicas

El ácido cítrico es una sustancia inodora, incoloro con un agradable, aunque fuerte sabor ácido. Algunas de las características del ácido cítrico en solución y en forma anhidra se representan en la Tabla 2.3.

Tabla 2.3. Propiedades físicas del ácido cítrico en solución y de forma anhidra.

	Sol. Saturada	Anhidro
Cristaliza	<36.6°C	>36.6°C
Cristales	Translúcidos e incoloros y pertenecen al sistema ortorrómbico	Translúcidos e incoloros, que pertenece a la clase holoédrica del sistema monoclinico.
Densidad Relativa	1.542	1.665
Calor de Combustión	30°C de 1973 kJ/mol	30°C de 1990 kJ/mol
Ablandamiento	75°C	-
P.F.	100°C	153°C

2.2.2 Producción

Además de ácido cítrico en frutas se encuentra en casi todas las especies de plantas y animales en diferentes proporciones como se menciona en la Tabla 2.4 (Verhoff, 2006).

Tabla 2.4. Contenido de ácido cítrico en algunas frutas comunes.

Frutas Comunes	Contenido de ácido cítrico (mg/100ml)
Lima	7000
Limón	5630
Frambuesa	2480
Grosella Negra	1170
Tomate	1018
Piña	605
Fresa	580
Arándano	202
Manzana	14

Cerca de 100 años después de que el AC había sido aislado de los cítricos, se sintetiza a partir de glicerol (Verhoff, 2006). El AC fue aislado por primera vez por Scheels Karls en 1874, en Inglaterra, a partir del jugo de limón importado de Italia. El hallazgo, en 1893, a raíz de que ciertos microorganismos secretan AC cuando se cultivan en medios de azúcar surgió la posibilidad de producir el ácido comercialmente por fermentación. El proceso industrial se abrió por primera vez por James Currie, en 1917, quien encontró que *Aspergillus niger* tenía la capacidad de producir cantidades significativas de AC en medio a base de azúcar. La primera operación exitosa de este tipo comenzó 1923 en Nueva York. (Muñoz, Sáenz, López, Cantú & Barajas, 2014).

La producción de AC se realiza desde principios del siglo XX por métodos fermentativos, obteniendo mucho mejor rendimiento que por procesos de síntesis química. La mayor parte del AC se fabrica a través de medios biológicos, principalmente a través de la fermentación sumergida de medios basados en almidón/sacarosa (melaza) exclusivamente por el hongo filamentoso *Aspergillus niger* debido a su alta productividad a pH bajo sin la secreción de subproductos tóxicos. El AC se considera como un metabolito del metabolismo energético cuya concentración aumentará a cantidades apreciables sólo en condiciones de desequilibrios metabólicos sustanciales. En los últimos años, se han investigado varios residuos y subproductos de residuos agrícolas

por su potencial para ser utilizados como sustrato para la producción del ácido cítrico mediante fermentación en estado sólido. Entre ellos se encuentran la melaza, los residuos de orujo de frutas, el salvado de trigo, la cáscara de café y el bagazo de yuca, entre otros, que se utilizan en compostaje o vertidos en rellenos sanitarios y causan riesgos ambientales.

La producción de ácidos orgánicos mediante el uso de microorganismos constituye una fuerza motriz de gran importancia para el estudio de regulaciones metabólicas, lo cual permite el desarrollo de la biotecnología.

El AC es el ácido orgánico más importante, cuya producción mundial ha llegado a 1.6 millones de toneladas anuales y se ha obtenido un crecimiento anual de 3.5 a 4.0% de la demanda/consumo de ácido cítrico.

En el mercado global, la mayor planta de producción se encuentra en Estados Unidos, la empresa Pfizer. Según la ECAMA (European Citric Acid Manufacturers Association) hay cuatro empresas que comercializan cítrico en la Unión europea: Gadot Biochemical Industries Ltd, en Israel; Citrique Belge, en Bélgica; Jungbunzlauer, en Francia y Cargill en Alemania. China está entrando en el mercado e implantando plantas con productos muy competitivos, que están revolucionando el mercado mundial del AC (ECAMA,2012). La situación comercial del ácido cítrico en México se representa en la Tabla 2.5 (Trade Map,1999-2015).

Tabla 2.5. Estadísticas del comercio en México para el ácido cítrico.

Año	Exportación (Ton)	Importación (Ton)
2012	110 851	59 088
2013	149 441	55 216
2014	1 017 640	54 412
2015	790 056	57 583
2016	504 581	64 390

México se ha encargado de proveer ácido cítrico principalmente a Estados Unidos y a Cuba principalmente, entre el año 2013 al 2014 hubo un auge en la cantidad exportada a EU alcanzando una cantidad de arriba de 800 mil USD provista a este país; después del 2014 dicha exportación fue decreciendo y se ha mantenido en caída hasta la fecha. La exportación hacia Cuba se mantuvo creciendo linealmente hasta el año 2015, donde comienza a tener un crecimiento menor como se puede observar en la Figura 2.6 (Trade Map,1999-2015).

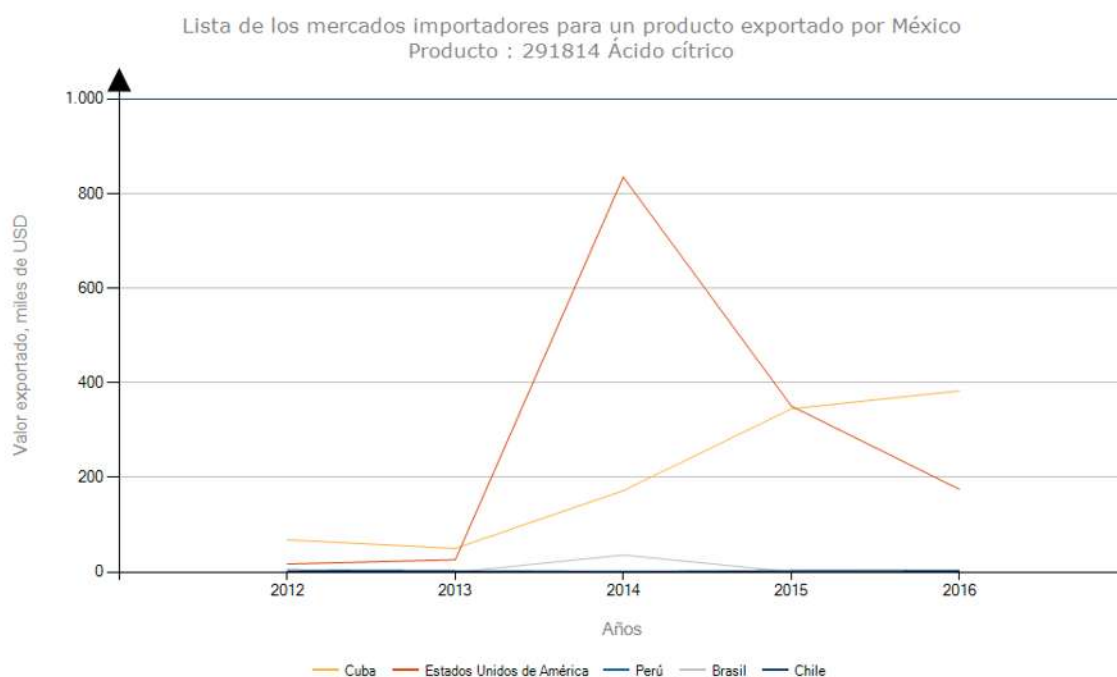


Figura 2.6. Mercados importadores de México.

Por otro lado, México importa en sobremanera AC desde China manteniéndose sobre los 30 000 miles de USD por año como se expresa en el gráfico de la Figura 2.7 (Trade Map,1999-2015). Debido a dichas cantidades expresadas en la importación y exportación que maneja México para este producto orgánico es palpable la necesidad de incursionar en las opciones a considerar para generar este producto agregado y proveer a México de una fuente de suministro necesaria en la vida humana.

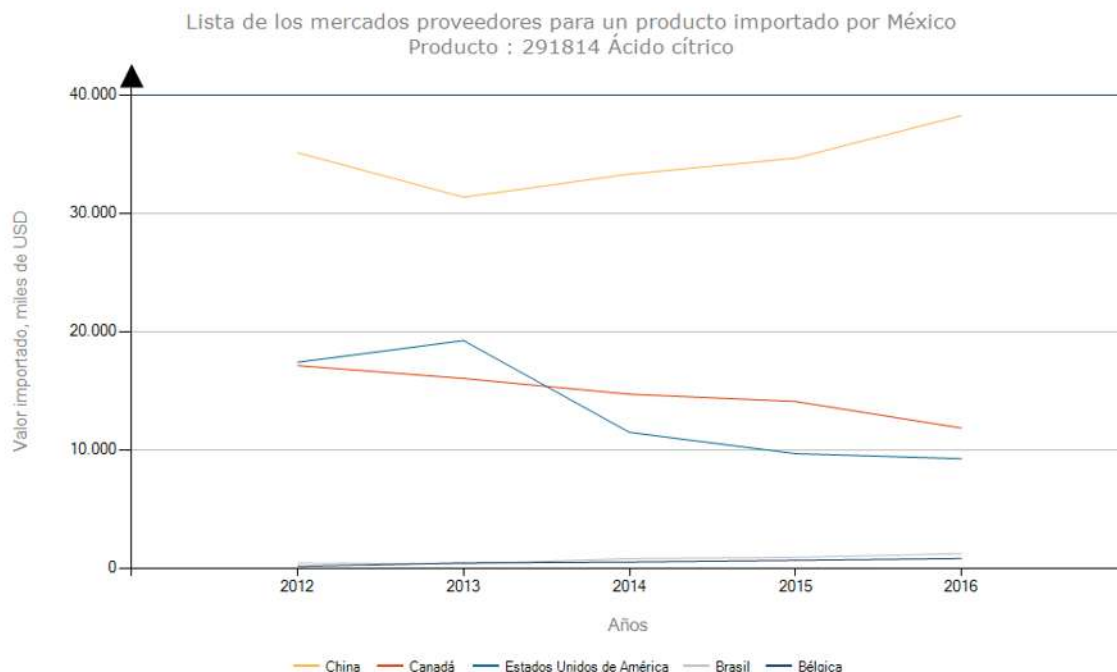


Figura 2.7. Mercados proveedores de ácido cítrico a México.

2.2.3 Aplicaciones Industriales

Alrededor del 99% de la producción mundial de ácido cítrico se produce a través de procesos microbianos, que pueden llevarse a cabo utilizando la superficie o cultivos sumergidos. El producto se vende como un ácido anhidro o monohidrato, y aproximadamente el 70% de la producción total de 1,5 millones de toneladas por año se utiliza en la industria de alimentos y bebidas como acidificante o antioxidante para preservar o mejorar los sabores y aromas de jugos de frutas, helados y mermeladas. 20% se usa, como tal, en la industria farmacéutica como antioxidante para conservar las vitaminas, efervescentes, correctores de pH, conservantes de sangre, o en la forma de citrato de hierro como fuente de hierro para el cuerpo, así como en tabletas, ungüentos y preparaciones cosméticas. En la industria química, se utiliza el 10% restante, se emplea como un agente de formación de espuma para el ablandamiento y el tratamiento de los textiles. En la metalurgia, ciertos metales se utilizan en forma de citrato. El AC también se utiliza en la industria de los detergentes como un sustituto de fosfato, debido al menor efecto eutrófico, y en el cemento al endurecimiento de éste (Kumar y col. 2008), en el

área de materiales es ampliamente usado para la obtención de híbridos mediante la síntesis tipo sol-gel.

Los estudios revelan el uso potencial de ácido cítrico en biopolímeros, para la administración de fármacos, ingeniería de tejidos para el cultivo de una variedad de células y muchas otras aplicaciones biomédicas prometedoras, además del uso ambientalmente sostenible de AC para la eliminación eficiente de residuos de flujo post-soldadura por los militares. La Tabla 2.6 resume las aplicaciones del ácido cítrico (Vandenberghe, et. al., 1999).

Tabla 2.6. Aplicaciones del ácido cítrico.

Industria	Aplicaciones
Bebidas	Proporciona acidez y complementa los sabores de frutas y bayas. Aumenta la eficacia de los conservantes antimicrobianos. Se utiliza en el ajuste del pH para proporcionar acidez.
Jaleas, mermeladas y conservas	Proporciona acidez. Ajuste de pH.
Dulces	Proporciona acidez. Minimiza la inversión de sacarosa. Produce color oscuro en caramelos duros. Actúa como acidulante.
Fruta congelada	Disminuye el pH para inactivar las enzimas oxidativas. Protege el ácido ascórbico al inactivar metales traza
Productos lácteos	Como emulsionante en helados y quesos procesados; Agente acidificante en muchos productos de queso y como un antioxidante.
Grasas y aceites	Sinérgico para otros antioxidantes, como secuestrante.
Productos farmacéuticos	Como efervescente en polvos y tabletas en combinación con bicarbonatos. Proporciona una rápida disolución de los ingredientes activos. Acidulante en formulación astringente suave. Anticoagulante.
Cosméticos y artículos de tocador	Ajuste de pH, antioxidante como un quelante de iones metálicos, agente tampón.
Limpieza de metales	Elimina óxidos metálicos de la superficie de metales ferrosos y no ferrosos, para la limpieza preoperacional y operativa de óxidos de hierro y cobre
Otros	En galvanoplastia, cobre, curtido de cuero, tintas de impresión, compuestos de lavado de botellas, cemento para pisos, textiles, reactivos fotográficos, hormigón, yeso, refractarios y moldes, adhesivos, papel, polímeros, tabaco, tratamiento de residuos, neutralizante y agente buffer.

El AC solo se acumula cuando varios nutrientes se encuentran a alta concentración (azúcar, acidez y oxígeno disuelto) y otros, se encuentran en condiciones sub-óptimas (elementos traza, nitrógeno y fosfato); observación que realizaron Shu y Johnson (1948). Papagianni, 2007, en acuerdo con reportes anteriores, comenta que son muchos los eventos bioquímicos que contribuyen en conjunto a esta sobre-producción y que, dada su naturaleza bioquímica, es imposible valorar la influencia de factores individuales sin tener en cuenta la influencia de los otros. El ácido cítrico, en condiciones naturales no puede ser producido como metabolito primario en altas cantidades. Por lo tanto, cualquier excreción elevada se interpreta como el resultado de una irregularidad metabólica causada genéticamente o de un desbalance metabólico severo, que puede obedecer también a condiciones ambientales (Gómez, Sánchez & Muñoz, 2014).

2.3 Aspergillus

Es un hongo filamentoso, su nombre hace referencia al color negro de sus esporas. Se clasifica dentro de la familia *Trichocomaceae*, orden *Eurotiales*, clase *Eurotiomycetes*, *filum Ascomycota*.

Aspergillus niger es un miembro del género *Aspergillus* que incluye un conjunto de hongos que generalmente se consideran asexuales, aunque se han encontrado algunos hongos que se reproducen sexualmente. El género *Aspergillus* incluye una gran cantidad de especies que son ubicuas en la naturaleza. Están ampliamente distribuidos y se han observado en una amplia gama de hábitats, ya que pueden colonizar una gran variedad de sustratos. Particularmente, *A. niger* se encuentra comúnmente como saprófito que crece en hojas muertas, granos almacenados, pilas de composta y vegetación en descomposición (Juárez & Favela, 2015).

2.3.1 Morfología

Aspergillus niger según la taxonomía moderna se encuentra en el phylum *Ascomycota*, dentro de la clase de los *Eurotiomycetes*. Es un hongo ubicuo que crece muy rápido. Las cepas se pueden aislar de muchos hábitats ecológicos diferentes, tales

como el suelo, restos vegetales, fruta podrida, medios aéreos, incluso en interiores. Macroscópicamente, este hongo se identifica por formar colonias de fieltro color amarillo e hifas blancas, volviéndose negro con la formación de conidios. Microscópicamente, *A. niger* por sus hifas hialinas septadas y conidióforos asexuales son identificados por ser largos, lisos, incoloros o de color café, con fiálides biseriadas y conidios redondos y globosos en la punta, como se puede apreciar en la Figura 2.8. La cabeza conidial, su color, forma, tamaño y organización de las partes es característico de cada especie. Las cabezas de *A. niger* son más largas, radiadas y negras, amarillosas-cafesosas. La pigmentación, es una característica inherente de cada especie y puede reflejar la capacidad de absorción de algún pigmento de una fuente externa. (Gómez, Sánchez & Muñoz, 2014; Juárez & Favela, 2015).

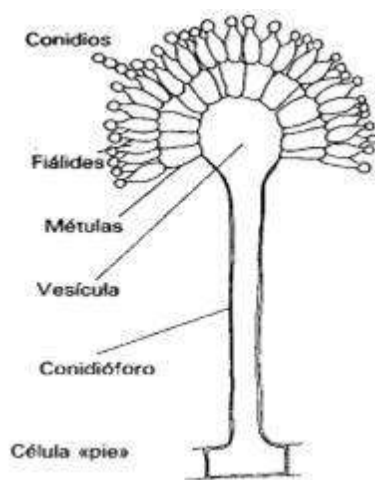


Figura 2.8. Morfología de *Aspergillus niger*.

2.3.2 Características

Este hongo es empleado en varios procesos industriales, por la variedad de enzimas que produce y por qué no necesita medios exigentes ni condiciones estrictas para su crecimiento.

A partir de la construcción de las rutas metabólicas los autores investigaron porqué *A. niger* es un eficiente productor de ácidos orgánicos. Lo que se explica por el hallazgo

de numerosas enzimas involucradas en la formación del principal precursor del citrato, el oxaloacetato. En total se encontraron 2 piruvato carboxilasas (una citoplasmática y una mitocondrial), 4 malatos deshidrogenasas (3 citoplasmáticas y una mitocondrial), además se encontró un transportador mitocondrial de oxaloacetato, 4 citrato sintasas (una citosólica y tres mitocondriales). También se encontró redundancia de la enzima aconitasa. Adicionalmente se encontraron tres transportadores de ácido cítrico en la membrana citosólica (University of Groningen, 2007).

Las principales ventajas de *A. niger* sobre muchos otros microorganismos son su facilidad de manejo/siembra, su capacidad para fermentar una variedad de materias primas, preferiblemente residuos de residuos agrícolas y altos rendimientos del producto. Además de ser una cepa económicamente eficiente.

Estos hongos filamentosos son los microorganismos más adecuados para crecer sobre diversos sustratos. La regulación fina y el control del flujo glicolítico, la secreción de ácido cítrico de las mitocondrias y el citosol, y las características de crecimiento y adaptabilidad de *A. niger* en diversos hábitats juntos contribuyen a la acumulación masiva de AC. La regulación de diferentes enzimas metabólicas, junto con el efecto de varios factores positivos sobre el flujo glicolítico, favorece una alta formación de AC y una degradación aún más baja a través del ciclo.

2.3.3 Fermentación Líquida

Sobre otros tipos de fermentación, FL presenta varias ventajas, tales como una mayor productividad y rendimiento, menores costos laborales y menor riesgo de contaminación. Los procesos de fermentación sumergidos pueden realizarse en fermentación por lotes y en lotes alimentados. Dependiendo de las condiciones de fermentación, se concluye en 5 a 12 días. Aunque la fermentación sumergida es el método ampliamente empleado para la producción en masa de AC.

La obtención de AC está fuertemente influenciada por la composición del medio, especialmente en los procesos de fermentación sumergida. Se ha demostrado que los

factores que afectan principalmente a la fermentación cítrica son el tipo y la concentración de la limitación de fuente de carbono, nitrógeno y fosfato, pH, aire, la concentración de oligoelementos, y la morfología del microorganismo productor. Ciertos nutrientes tienen que presentarse en exceso (tales como azúcares y proteínas), otros en los niveles limitantes (aquellos que contengan fosfato) y otros por debajo de los valores umbral bien establecidos (por ej. trazas de metales, particularmente de manganeso) (Muñoz, Sáenz, López, Cantú & Barajas, 2014).

Para conseguir acumular AC se debe bloquear su transformación en isocitrato, esto se consigue al reducir la presencia de iones hierro, cofactor de la aconitasa (enzima que cataliza este proceso). Pero este bloqueo podría causar la muerte del hongo productor. Otro punto a considerar importante en la fermentación, es la pérdida de oxalacetato, intermediario previo a la formación de AC. Esto ocurre por la oxalacetato hidrolasa, enzima que lo convierte en oxalato y acetato, a pH superior a 4. Para evitarlo, se trabaja a pH 3.5 (o valor menor) donde esta enzima en principio, queda desactivada. Para la expulsión del ácido cítrico fuera de la célula, se consigue aumentando los niveles de manganeso, que forma parte de la síntesis de lípidos de membrana plasmática. Se consiguen membranas más permeables, que facilitan la excreción del producto celular (Gómez et. a., 2014).

2.3.4 Sustratos

La mayor parte de la producción a nivel industrial implica la fermentación sumergida utilizando *A. niger* cultivado en medios que contienen glucosa o sacarosa, especialmente de subproductos de la industria azucarera. Aparte de esto, se han empleado otras fuentes de materias primas como fuentes de carbono, tales como hidrocarburos, residuos de residuos agroindustriales y otros materiales amiláceos; como lo son el arroz, el maíz y los granos de cereales, la paja de trigo y arroz, la pulpa de la manzana, la médula de coco, los residuos de frutas, los desechos de té y café, los residuos de yuca y los granos de destilería entre otros.

Además de la fuente de carbono, la concentración de éste nutriente es crítica para la producción de ácido cítrico. Una alta concentración de azúcar incrementa la actividad de algunas enzimas glicolíticas y de la importante enzima piruvato carboxilasa que promueve la síntesis de oxalacetato necesario para el ciclo de Krebs (Gómez et. al., 2014).

2.3.5 Fuente de Nitrógeno

Una concentración elevada de nitrógeno aumenta la formación de biomasa, controla el pH y el consumo de azúcares, pero disminuye la cantidad de AC producida. (Vandenberghe, Soccol, Pandey & Lebeault, 1999). Entonces, la concentración de fuente de nitrógeno requerida para la fermentación del AC va a depender el sustrato empleado como fuente de carbono y del volumen del medio.

Fisiológicamente los compuestos de amonio son los preferidos, debido a que, durante su consumo, el pH del medio disminuye, pre-requisito para la producción de AC (Gómez et. al., 2014).

2.3.6 Fuente de Fosforo

El hongo requiere fósforo a una concentración de 0.5 a 5.0 g/l aproximadamente en un medio químicamente definido para la producción máxima de AC. Los bajos niveles de fosfato favorecen la producción, sin embargo, se demostró que la presencia de exceso de fosfato conduce a la formación de ciertos ácidos azucarados, a una disminución de la fijación de CO₂ y a la estimulación del crecimiento del microorganismo (Vandenberghe, Soccol, Pandey & Lebeault, 1999).

De acuerdo con Shu & Johnson (1948) los fosfatos son limitantes para la producción de AC. Sin embargo, cuando los metales trazas no son limitantes, incrementar la concentración de fosfatos puede resultar en reacciones colaterales e incremento de la biomasa, con detrimento de la producción de ácido cítrico (Papagianni et al, 2007; Gómez et. al., 2014).

Nutrientes

Los nutrientes afectan la reproducción y el crecimiento de *A. niger*, lo que conduce a un efecto sobre la producción de AC. Los nutrientes han sido de gran interés para los investigadores debido al efecto de estos factores sobre la actividad metabólica de *A. niger* y la tasa de producción de AC.

2.3.7 Iones Metálicos

Este organismo requiere ciertos metales traza para el crecimiento. Los metales que deben ser limitantes incluyen Zn, Mn, Fe, Cu, metales pesados y metales alcalinos. Se sabe que algunos iones metálicos inhiben la producción de CA por *A. niger* en fermentación sumergida incluso a una concentración muy baja. Por lo tanto, la concentración de estos metales pesados debe disminuir muy por debajo de la concentración requerida para un crecimiento óptimo, así como para la producción máxima de CA.

El anabolismo celular de *A. niger* se ve afectado por la deficiencia total de Mn y/o la limitación de nitrógeno y fosfato. El manganeso también ha demostrado ser importante en muchas otras funciones celulares, especialmente la síntesis de la pared celular, la esporulación y la producción de metabolitos secundarios (Gómez, et. al., 2014).

Se encontró que el Fe, Cu, Mn y Zn, en concentraciones muy bajas y controladas, son esenciales para una óptima acumulación de ácido cítrico (Gómez, et. al., 2014). Shu y Jhonson (1948), demostraron que la producción de ácido cítrico se ve drásticamente afectada por altas concentraciones de Mn.

La deficiencia de Mn ocasiona reducción de la actividad de algunas enzimas de la vía anabólica de las pentosas fosfato y concentra la actividad en el ciclo de ácidos tricarboxílicos, hecho favorable al proceso industrial. Adicionalmente resulta en daños en el anabolismo, entre los cuales se destaca la generación de un consorcio de iones amonio como resultado de la degradación proteica, esta alta concentración de amonio intracelular

es un potente regulador de la fosfofructokinasa, ya que la libera de la inhibición por citrato (Gómez et. al., 2014).

El cobre, se utiliza para controlar la morfología. Si se utiliza en exceso, inhibe completamente el crecimiento y genera una estructura peletizada muy densa, la cual es improductiva. El cobre no sólo inhibe el crecimiento sino también la producción de AC, por inhibición de enzimas como la aconitasa e isocitrato deshidrogenasa. El contenido de ADN y proteínas decrecía mientras que los lípidos y polisacáridos aumentaban por efecto de este elemento. Altos niveles de cobre pueden inhibir el transporte de citrato (Gómez et. al., 2014).

El hierro y el manganeso, en exceso, por su parte tienen efectos completamente contrarios al presentado por el Cu. Siendo activadores del crecimiento, ocasionan elongación de hifas y finalmente un caldo espeso donde la transferencia de oxígeno es ineficiente y ocasiona baja acumulación de AC. La excreción del citrato al exterior de la célula sólo puede demostrarse previo al cultivo de *A. niger* en condiciones deficientes de Mn (Gómez et. al., 2014).

Condiciones Ambientales

Las condiciones ambientales influyen en los procesos biológicos potenciando o controlando las actividades microbianas. La temperatura y el pH son los principales factores ambientales que intervienen en el crecimiento celular.

2.3.8 Temperatura

Los microorganismos pueden crecer en un rango de temperaturas específico como se puede apreciar en la Tabla 2.7, en general, aquellos dedicados a degradar sustancias orgánicas son del tipo mesófilo los cuales tienen una temperatura óptima de 30⁰ C, dado que a mayores valores la estabilidad de las enzimas se ve afectada por su desnaturalización y la integridad de su membrana plasmática pierde funcionalidad y estabilidad. A menores temperaturas las enzimas pierden flexibilidad y la membrana plasmática reduce su capacidad de transporte activo. Los microorganismos psicrófilos y

los hipertermófilos lograron adaptaciones tales que sus enzimas y membranas plasmáticas no se afectan a las temperaturas extremas en las que evolucionaron (Gómez & Cancino, 2011). Las fermentaciones como es de esperarse, también se ven afectadas por la temperatura.

El efecto de la Temperatura es de vital importancia porque debe tomarse en cuenta la temperatura óptima de crecimiento de la cepa. Para el caso de *A. niger* maneja un rango de temperatura que va de los 20°C a los 35°C por lo que se considera dentro del tipo mesófilos.

Tabla 2.7. Temperatura óptima de crecimiento de las cepas.

Clasificación	Rango	Temperatura óptima
Hipertermófilos	< 70 °C	-
Termófilos	28 – 80 °C	50 – 60 °C
Mesófilos	10 – 45 °C	20 – 40 °C
Psicrófilos	-5 - -30 °C	10 – 20 °C

2.3.9 pH

Los hongos prefieren ambientes ácidos que van de 1 a 3 unidades de pH comportándose como microorganismos acidófilos. Los valores máximos y mínimos de supervivencia de un microorganismo difieren en tres unidades. El nivel de pH puede afectar actividades celulares tales como el transporte activo de la membrana plasmática y el equilibrio de las reacciones catalizadas por enzimas (Gómez & Cancino, 2011).

El efecto del pH es de suma importancia al llevarse a cabo un proceso fermentativo, debido a que la mayoría de los microorganismos crecen en pH cercanos a la neutralidad, aunque algunos son capaces de crecer en medios ácidos. Dependiendo del rango de pH del medio en donde se desarrollen los microorganismos se clasifican de acuerdo a la Tabla 2.8.

Tabla 2.8. Clasificación de los microorganismos según su pH.

Clasificación	pH externo	pH interno
Acidófilos	1 – 5	6.5
Neutrófilos	5.5 - 8.5	7.5
Alcalófilos	9 - 10	9.5

El pH es importante primero, porque las esporas requieren un pH relativamente alto para germinar (3 - 5); y segundo, porque mantener un pH bajo favorece el proceso de la fermentación. El pH óptimo para la fermentación se encuentra entre 1.7 y 2.0, valor que favorece la producción de ácido cítrico y que permite controlar poblaciones contaminantes y la producción de otros metabolitos como el ácido oxálico y glucónico que tienden a acumularse a pH superiores (Gómez et. al., 2014). De acuerdo con Papagianni (2007), incrementar el pH a 4.5 durante la fase de producción podría reducir el rendimiento de la fermentación en 80% y afectar negativamente la morfología del microorganismo.

2.3.10 Agitación

La agitación es considerada como uno de los parámetros más importantes en las fermentaciones aerobias, ya que asegura la homogeneidad con respecto a la temperatura y al medio ambiente. Mejora las condiciones de crecimiento microbiano y permite una distribución uniforme y más eficaz de la suspensión de esporas, del agua necesaria para el control de la humedad y/o de cualquier otra solución nutritiva, si es necesario.

Aunque se ha establecido que existe una estrecha relación entre la morfología del hongo y la productividad en ácido cítrico (Papagianni, 2007); no existe un acuerdo acerca de si la morfología más adecuada es la filamentosa o la peletizada, ambas morfologías dependen de condiciones de cultivo y genotipo de la cepa (Gómez et. al., 2014).

2.4 Antecedentes

De acuerdo a la bibliografía consultada, se presentan los resultados de algunas investigaciones conforme al microorganismo, así como del sustrato empleados que representan el antecedente del cual se parte en este trabajo en la Tabla 2.9.

Tabla 2.9. Compilado de investigaciones donde sus resultados sugieren puntos relevantes para anteceder el trabajo a desarrollarse.

Autor	Año	Sustrato	Microorganismo	Resultado
Jaehoo & Young	1991	Sacarosa	<i>A. niger</i>	Los requerimientos de N para la producción de ácido cítrico deben estar acorde a la concentración de fuente de carbono que se emplea.
Samragy et. al.	1996	Suero de leche	<i>A. niger</i>	Se alcanzó una producción máxima de 1.06 g/l de ácido cítrico empleando el suero de leche desproteizado
Infante et. al.	1999	Glucosa	<i>A. wentii</i>	Primer informe donde se reporta que la deficiencia de metales traza provoca un incremento en la producción de ácido cítrico
Sáez et. al.	2002	Sacarosa y Almidón	<i>A. niger</i> AL01	Se producen bajas cantidades de ácido cítrico (1.113g/l en sacarosa y 0.209 g/l en almidón).
Abínet. Al.	2004	Azúcar de caña	<i>A. niger</i> O-5	El cultivo sumergido favoreció el crecimiento del hongo y su producción de ácido cítrico se incrementó en casi 5 g/L con relación al cultivo superficial a los 7 d de incubación.
Rymowicz et. al.	2006	Glicerol	Cepas mutantes de acetato de <i>Y. Lipolytica</i> .	Producen altos niveles de ácido cítrico.
Mesa et. al.	2007	Goma de Anacardium occidentale	<i>A. niger</i> ATCC 11414	Los resultados muestran que el medio con base en la goma de <i>A. occidentale</i> es adecuado para el crecimiento de <i>A. niger</i> y podría ser útil en aplicación biotecnológica.
Velásquez et. al.	2010	Plátano dominico hartón maduro	<i>A. niger</i>	La eficiencia de producción se obtuvieron 13.5 g/L de ácido cítrico.
Vieira et. al.	2010	Glicerol	<i>Y.lipolytica</i> IMUFRJ 50682	La producción máxima de ácido cítrico fue 16.49 g / L empleando glicerol residual.
Sánchez et. al.	2010	Glucosa	<i>A. niger</i> 10	Altas concentraciones de glucosa y bajas concentraciones de iones divalentes presentan mayor acumulación de ácido cítrico.
Leal et. al.	2011	Suero lácteo	<i>A. niger</i> 765	<i>A. niger</i> tiene la capacidad de desdoblar por sí mismo la lactosa por lo que los hidrolizados no son necesarios. Para el suero entero se produjeron 8.7 g/l de ácido cítrico y para el suero hidrolizado 9.6 g/l.
Gómez et. al.	2012	Sacarosa	<i>A. niger</i> mejorada por UV	el P y K son nutrientes fundamentales y determinantes para el rendimiento y productividad de la fermentación de ácido cítrico, así como para la producción de biomasa y expresión morfológica

CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA

3.1 Purificación del Sustrato

La materia prima fue otorgada por Biodiesel Moreco S. A. de C. V. que es una empresa dedicada a la recolección de aceites vegetales y grasas animales de desecho para su posterior conversión a biodiesel; ubicada en Tarímbaro, Michoacán

Haciendo una adaptación de la metodología empleada por Robles y Quesada (2013), se tiene a continuación.

Se coloca una muestra de glicerol en un matraz balón y se destila el exceso de metanol a 75°C (64.7°C punto de ebullición del metanol) empleando un sistema de destilación simple.

Una vez eliminado el metanol, se coloca la muestra caliente en un vaso de precipitados, donde se mantiene a 60 °C en un baño maría con agitación constante. El pH de la muestra se ajusta a un valor de 3.0 con HCl, a continuación, la muestra se coloca en un embudo separador para el proceso de decantación, donde se observa la formación de dos fases, la capa superior es la fase orgánica compuesta de jabones y ácidos grasos libres; y la capa inferior es la fase acuosa donde se encuentra la glicerina. Al hacer el ajuste del pH partiendo de un pH de 10 - 11 hasta acidificar la muestra (pH menor a 4) los jabones se convierten en ácidos grasos libres como se muestra en la Figura 3.1 a continuación, dando como resultado una solución turbia.

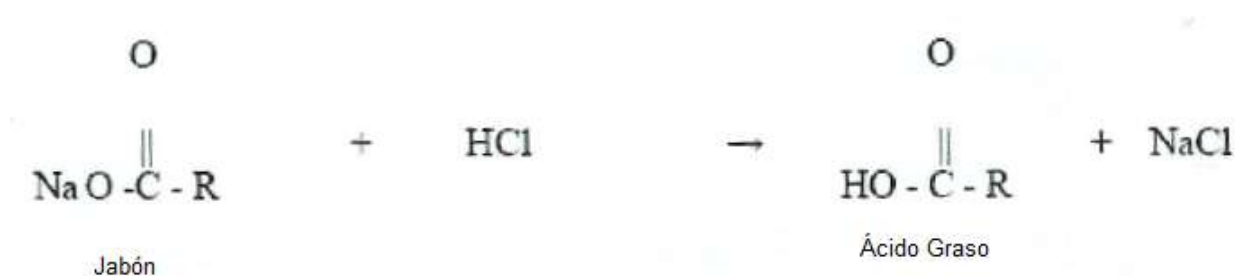


Figura 3.1. Formación de ácidos grasos libres a partir de la reacción de los jabones con HCl.

La fase acuosa se recolecta en un vaso de precipitados, y por cada muestra de 250 ml y se le adicionan 20 ml de EtOH al 95 %, lo cual genera la precipitación de algunas sales. Posteriormente se filtra con vacío empleando papel filtro Whatman #4 y se realizarán varios lavados con porciones de 10 ml de etanol para evitar que la muestra quede retenida en las sales.

A continuación, la muestra se neutraliza a un pH de 7.0 con NaOH, y nuevamente se realiza en proceso de filtración para eliminar las nuevas sales inorgánicas formadas

Por último, se realiza una destilación para eliminar el etanol empleado y la mayor cantidad posible de agua.

Se resume todo este proceso en la Figura 3.2, presentada a continuación.

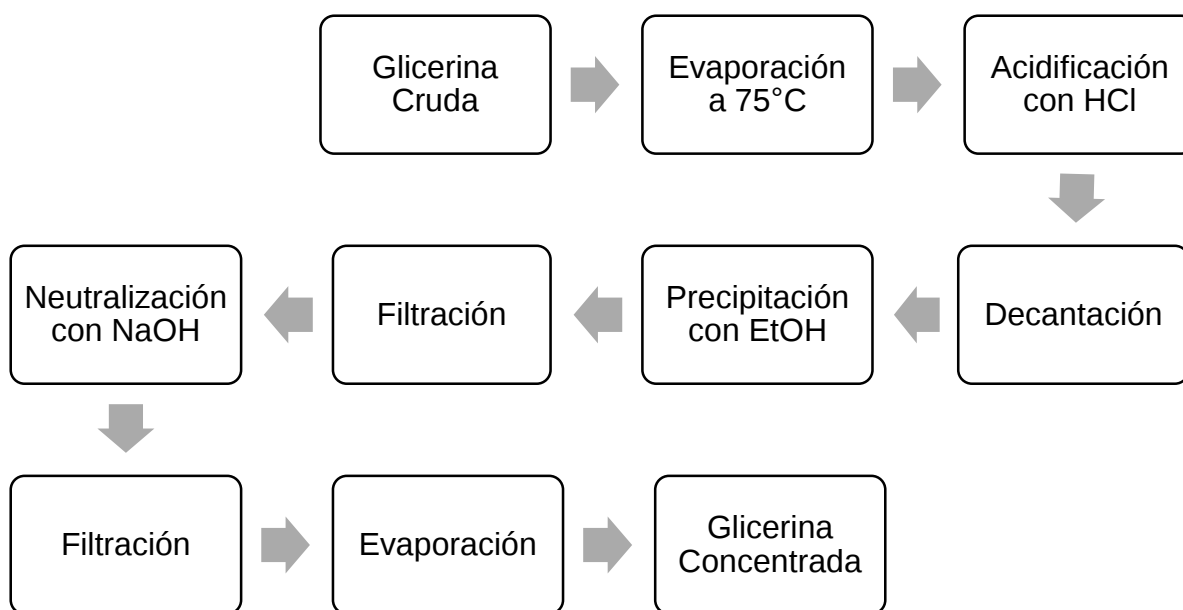


Figura 3.2. Proceso de purificación de la glicerina.

3.2 Caracterización del Sustrato

Una vez obtenidas las muestras para cada una de las etapas de purificación seleccionadas para los ensayos se procede a hacer las siguientes pruebas para caracterización fisicoquímica.

3.2.1 Determinación de pH

La medición de pH se lleva a cabo utilizando un pHmetro HANNA el cual requiere una calibración previa de sus electrodos a dos puntos usando soluciones buffer de valores 7.00 ± 0.01 y 4.00 ± 0.01 en la escala. Este procedimiento se lleva a cabo siguiendo las indicaciones del manual del pHmetro.

Se toman 15 ml de cada muestra, se introduce el electrodo durante 5 minutos, (tiempo requerido para la estabilización de su valor de pH) y se realiza la medición. Siempre debe considerarse realizarse con la mayor limpieza para evitar la descalibración del equipo y obtener resultados erróneos.

3.2.2 Determinación de Densidad

La densidad es medida utilizando un picnómetro de 5 ml limpio y seco en cada una de las muestras. Inicialmente se pesa el picnómetro vacío y luego con muestra de glicerol crudo.

Se emplea la siguiente ecuación para el cálculo:

$$\rho = \frac{m - m_0}{vol_{pic}}$$

Donde:

$$\rho = \text{densidad de la muestra de glicerol} \left(\frac{g}{ml} \right)$$

$$m = \text{masa del pic. con muestra de glicerol (g)}$$

$$m_0 = \text{masa del pic. vacío (g)}$$

$$vol_{pic} = \text{volumen del pic. (ml)}$$

3.2.3 Caracterización Cromatográfica del Glicerol y Dextrosa

Los reactivos y el material utilizados en la identificación y cuantificación cromatográfica son de calidad HPLC.

Cada muestra debe ser diluida con agua grado HPLC y homogenizada durante 5 min (las muestras que son tomadas del caldo al final de las fermentaciones no se diluirán, deben ser filtradas y centrifugadas); para ser posteriormente pasada por medio de una jeringa a través de microfiltros de 0.45 μm y siendo almacenadas en viales.

Las muestras se inyectan en un cromatógrafo líquido de alta eficiencia (HPLC), Waters e 2695 utilizando una columna Carbohydrate Analysis. Las condiciones de operación son las siguientes: volumen de inyección de 10 μL , fase móvil de acetonitrilo-agua (80-20); flujo de 1.5 ml/min; temperatura de la columna y del detector de 20°C.

La determinación y cuantificación del glicerol, se lleva a cabo mediante la técnica de patrón externo, usando materiales de referencia grado analítico con una curva de calibración (ver anexos).

3.3 Microorganismo

La cepa de *Aspergillus niger* empleada fue donada por el Departamento de Ingeniería química y bioquímica del Instituto Tecnológico de Ciudad Hidalgo, aislada de residuos de frutas.

3.3.1 Conservación y Proliferación de la Cepa

La siembra del hongo se realiza a través de la preparación de medio PDA (agar papa-dextrosa) (comercial). Luego de la preparación del medio de conservación (siguiendo las instrucciones que describe el medio), se coloca en un autoclave a 121°C durante 15 min para su esterilización. Concluido ese tiempo la solución es vaciada en cajas Petri desechables (estériles) a un volumen aproximado de 1/3 de su capacidad, procurando siempre tener la zona estéril. Se deja reposar por 20 min hasta su solidificación y se albergan en una incubadora a 30°C. Posteriormente se dejan de 24 a

48 horas dentro de la incubadora como testigo; si el medio sólido no presenta contaminación por algún microorganismo, se prosigue con el sembrado de la cepa (*Aspergillus niger*) mediante un asa y un par de mecheros (procurando siempre mantener zona de esterilidad) estriando en forma de abanico, procurando un espacio para su reproducción dentro del medio. Al terminar la técnica se coloca nuevamente en la incubadora dejando transcurrir un tiempo de 6 a 7 días para su crecimiento (Esta técnica debe realizarse una vez al mes para preservar la cepa).

Suspensión de Esporas

Previamente a la suspensión de esporas se debe lavar y esterilizar todo el material que se debe emplear.

Se inundan las cajas Petri con agua destilada estéril con la ayuda de una pipeta pasteur, después con una varilla de vidrio en forma de L se acarrean las esporas suspendidas (sin raspar el fondo). La solución formada se vierte en tubos de ensaye con tapa para su centrifugación; se retira cuidadosamente el agua remanente de la disolución junto con micelio que pudiese haber presentado. Se vierte agua destilada estéril y se realiza una agitación suave, posterior a esto se centrifuga nuevamente. Se repite este paso hasta que no se visualice materia diferente a las esporas o exceso de color además de ir uniando la suspensión de cada uno de los tubos hasta tenerla en uno solo.

Finalmente, con ayuda de un microscopio y la cámara de Neubauer se realiza el conteo de esporas para obtener la concentración final de esporas (se realiza una dilución seriada de ser necesario para tener un mejor campo de visualización de las esporas en el microscopio y así mismo facilitar su conteo).

La suspensión de esporas se colocará en un tubo de ensaye bien sellado y conservado en refrigeración hasta su uso en las fermentaciones.

3.4 Fermentación

En esta etapa se realiza una revisión bibliográfica exhaustiva con el fin de obtener información que nos permita seleccionar las condiciones adecuadas para nuestra materia prima; las condiciones del sistema para llevar a cabo la síntesis y a su vez la composición que del medio de fermentación. Todo esto en base a un análisis de las condiciones en las que *Aspergillus niger* suele emplear para producir ácido cítrico.

Dado que se tendrán rangos de condiciones de operación y de rangos para cada uno de los nutrientes que requiere la composición del medio se deberá emplear diseños experimentales adecuados, en donde en función del análisis de los resultados que estos arrojen se tendrá la necesidad de ir modificando las fronteras y las variables a analizar.

Además, los caldos de cultivo requieren de elementos traza para el mejor funcionamiento metabólico del microorganismo por lo que en todos los ensayos se adicionó una solución estándar, cuya composición se puede encontrar en la Tabla 3.1 a continuación.

Tabla 3.1. Micronutrientes utilizados en los medios.

Oligoelementos por litro de medio	
Urea	0.1 g
Cloruro de calcio	0.3 g
Sulfato de hierro heptahidratado	5 mg
Sulfato de manganeso monohidratado	1.6 mg
Cloruro de cobalto	2 mg
Sulfato de zinc heptahidratado	1.4 ml

3.5 Análisis del Ácido Cítrico

3.5.1 Determinación de Biomasa (Peso Seco)

Primeramente, se debe poner a secar el papel filtro a emplear a 75°C y registrar el peso cada 10 min por 2 horas hasta peso constante.

Se filtra el caldo de fermentación con el papel previamente esterilizado y el filtrado se recibe en un tubo falcón (estéril), se separan las muestras necesarias para las demás determinaciones y el restante se almacena en congelación para determinaciones posteriores.

Se coloca el papel filtro que contiene la biomasa sobre un recipiente, se ubica a secar a 75 °C llevándose un registro del peso cada 15 minutos. El proceso se realiza hasta asentar un peso constante y por diferencia de peso se determina la biomasa.

3.5.2 Determinación de pH

Previamente se debe revisar que el pHmetro se encuentre calibrado.

Se mide una alícuota de 15 ml del filtrado obtenido en el proceso de determinación de crecimiento celular y se introduce el electrodo durante 5 minutos, (tiempo requerido para la estabilización de su valor de pH) y se realiza la medición. Siempre debe considerarse realizarse con la mayor limpieza para evitar la descalibración del equipo y obtener resultados erróneos.

3.5.3 Determinación de Ácido Cítrico mediante el Método Marier & Boulet (1958)

El filtrado se hace reaccionar con piridina y anhídrido acético, los cuales junto con el ácido cítrico forman un compuesto de coloración amarilla (Ácido 2-aceto1,3,5-propanotricarboxílico) como se puede observar en la Figura 3.3, esta reacción se analiza en un espectrofotómetro de UV-VIS Libra S12.

En tubos con tapón se añade 1 ml del filtrado del caldo de fermentación, se añaden 1.3 ml de piridina cerrando el tubo inmediatamente y agitando suavemente. Posteriormente se adiciona 5.7 ml de anhídrido acético cuidando hacerlo lo más rápido posible y manteniendo el tubo destapado solo el tiempo justo; se agita suavemente (extremar precauciones dado que se presenta una reacción exotérmica) y se deja reposar en baño de agua a 32°C ± 0.5 por 10 min. Hacer la lectura en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 420 nm.

Es importante que los tubos se mantenga cerrados ya que el anhídrido acético se evapora.

Se construye una curva de calibración (ver anexos) obteniendo una ecuación donde se interpolarán las lecturas de cada una de las muestras y con base a los datos obtenidos tendremos la concentración real de ácido cítrico resultante.

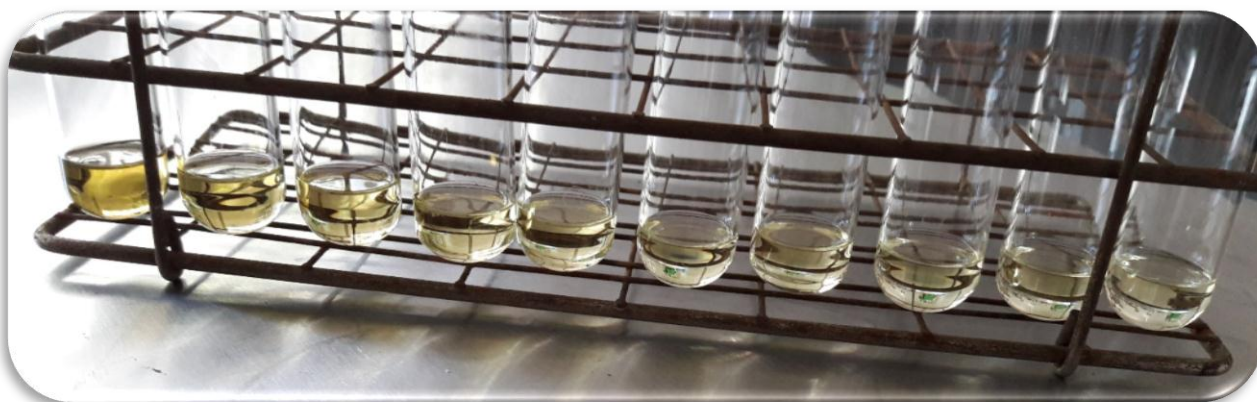


Figura 3.3. Coloración adquirida de la curva de calibración de ácido cítrico.

3.6 Determinación de los Rendimientos ($Y_{p/s}$)

Se evalúa el rendimiento de producto generado a partir del sustrato consumido, conforme a la siguiente ecuación mostrada a continuación.

$$Y_{p/s} = \frac{p}{s}$$

$Y_{p/s}$ = Rendimiento producto/sustrato

p = ácido cítrico (g/ml)

s = glicerol consumido (g/ml)

3.7 Análisis de la Información

Para el análisis de la información obtenida de las variables de respuesta se utilizaron los paquetes estadísticos de STATISTICA y de STATGRAPHICS Centurion XVI. Se empleará el diseño experimental Plackett-Burman para determinar las variables que son de mayor interés y posteriormente se empleará el diseño de Compuesto Central para optimizar las variables seleccionadas del DPB. Los resultados obtenidos de cada uno de los diseños serán analizados de acuerdo a la significancia de las variables y posteriormente empleando gráficos de contorno y de superficie, así como de los gráficos de los efectos principales e interacciones entre variables.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS

4.1 Purificación del Glicerol Residual

4.1.1 Glicerol Residual Proveniente de la Producción de Biodiesel a partir de Aceite de Coco

La muestra proporcionada contenía más del 50% (v/v) de biodiesel en ella, se atribuye a que la muestra que fue entregada era el resultado de la reacción de transesterificación y no solo el residuo producto de la separación del biodiesel de sus subproductos.

La primera etapa de purificación de la muestra consiste en hacer una destilación simple dónde se extrajeron 159 ml en un primer ensayo y 218 ml en un segundo de alcohol (se desconoce la información del alcohol empleado para satisfacer la producción del biodiesel). La segunda fase de la purificación de la muestra se llevó a cabo en dos partes: la primera donde se acidifica hasta llegar a un pH=6.2, la separación que se da en esta condición se muestra en la Figura 4.1 a); posteriormente dicha muestra se acidificó hasta llevarla a un pH=3.2, la separación de esta parte se representa con la Figura 4.1 b) Posteriormente fueron extraídos 400 ml de ácidos grasos y en una segunda prueba 528 ml. Hasta este punto solo se obtuvo un 0.65% (v/v) de glicerina de la muestra cruda, por lo que se opta no manejar esta muestra como sustrato para las fermentaciones.



a)

b)

Figura 4.1. a) Separación de la fase orgánica de la fase acuosa a un pH=6.2, b) Separación de la fase orgánica de la fase acuosa a un pH=3.0.

Para una mejor visualización de la cantidad de impurezas removidas en el proceso de purificación del residuo proveniente del aceite de coco se hace una evaluación porcentual y estos datos se resumen en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1. Resumen de los componentes obtenidos de la purificación de la muestra proveniente del biodiesel a partir de aceite de coco, representados en porcentajes.

Componente	% Obtenido
Biodiesel	> 50
Alcohol	28.1
Ácidos grasos	69.38
Glicerina	0.65

4.1.2 Glicerol Residual Proveniente de la Producción de Biodiesel a partir de Aceites Vegetales y Grasas Animales de Desecho

Con base a la bibliografía referida existen diversas variaciones entre las etapas intermedias para la purificación del glicerol, entre las más destacables se encuentra que

la dilución promueve la eliminación de todas las impurezas en cada etapa del proceso y que algunas de las propuestas es emplear de 2 hasta 4 veces el volumen de la muestra, el tipo de ácido a emplear para retirar los jabones (HCl , H_2SO_4 y H_3PO_4 ; además de otros ácidos orgánicos), lavados de etanol para precipitación de sales, las bases empleadas para neutralizar (KOH y NaOH) además de filtraciones intermedias, entre otras técnicas.

De acuerdo a lo anterior para el primer ensayo se fragmento la acidificación, la mitad de la muestra de dejo a un pH neutro y el restante se acidifico hasta un pH con valor de 6; y para la eliminación de sales se hizo doble filtración, la primera filtración se realizó para eliminar las sales formadas por los lavados con etanol y la segunda al neutralizar con NaOH .

En el segundo ensayo se manejó una dilución de 24% el volumen de la muestra libre de metanol además de que sólo se realizó una filtración para eliminar las sales, primeramente, habiendo echo los lavados con alcohol y posterior a ello la neutralización.

En el caso tres únicamente se diferenció de la purificación propuesta, el hecho de filtrar una vez para la eliminación de las sales.

En cada uno de los casos se siguió el esquema planteado para la purificación con las variantes mencionadas en los párrafos anteriores. En la Tabla 4.2 se adjuntaron los resultados de cada una de las etapas para cada uno de los casos de modo de resumen.

Tabla 4.2. Ensayos de purificación del glicerol.

	1	2	3
Muestra (ml)	580	697	602
Metanol (ml)	80	53.5	83.5
pH	9.6	9.5	9.6
HCl (ml)	40	44.5	48
pH	3.5	2.5	0.7
Ácidos grasos (ml)	194	188	203
EtOH	50	40	150
NaOH	0.75	1.05	1.08
pH	7	7.4	6.3
Sales	5.6	3.1	8.4
Alcohol/Agua	154	80	183
Glicerina	214	250	212

En la Figura 4.2 se muestran las imágenes más representativas del proceso de purificación. Así como en la Figura 4.3 se pueden observar las complicaciones encontradas de las variantes efectuadas en cada uno de los casos. Como lo es la formación de tres capas en el proceso de decantación las cuales se deben a la dilución realizada a la muestra, donde, la capa superior contiene los jabones y ácidos grasos; la capa intermedia es la glicerina y la capa inferior es una mezcla de glicerina con agua, sales e impurezas. Existe también una variación en el color de la glicerina y esto nuevamente es a causa de la dilución. En el caso 1 donde se manejó dos acidificaciones, la muestra que permaneció neutra tuvo formación de espuma y precipitación de sales durante el proceso de la segunda destilación.



Figura 4.2. Imágenes de las principales etapas de eliminación de impurezas de la muestra cruda.

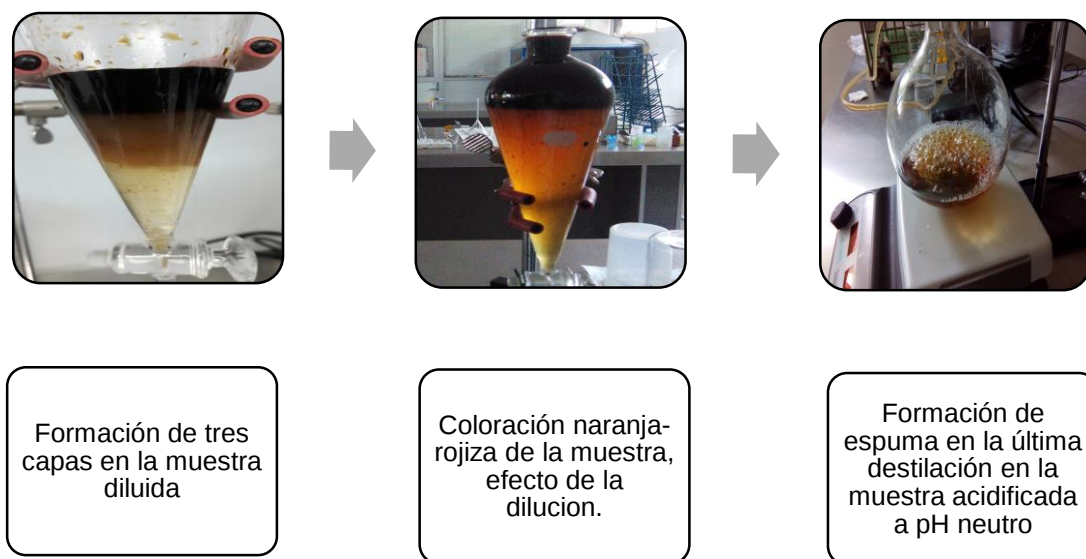


Figura 4.3. Complicaciones generadas en las variantes del proceso de purificación.

A manera de simplificar los resultados obtenidos en cada uno de los casos propuestos para el esquema de la purificación del crudo se representa la cantidad de las impurezas contenidas en las muestras a manera de porcentajes, los cuales se pueden divisar en la Tabla 4.3.

Tabla 4.3. Resumen de los componentes obtenidos de la purificación de la muestra proveniente del biodiesel a partir de aceite vegetales y grasas animales de desecho, representados en porcentajes.

Componente	% Obtenido		
	1	2	3
Biodiesel	14.71	1.34	4.44
Metanol	13.79	7.68	13.87
Ácidos grasos	33.45	26.97	33.72
Sales	0.96	0.45	1.4
Glicerina	36.9	35.87	35.22

Para finalizar la etapa de análisis de sustrato, con cada una de las muestras retenidas de las diferentes etapas de purificación se cuantificó el contenido de glicerol, así como la densidad de cada una de ellas, los resultados obtenidos se exponen en la Tabla 4.4 a continuación en donde se puede percibir el hecho de que, en el contenido de glicerol, así como la densidad es mayor en las muestras que llegaron hasta la última etapa de eliminación de impurezas.

Tabla 4.4. Densidad y concentración de las muestras en cada una de las etapas de purificación.

Caso	Etapas	ρ (g/ml)	Concentración* (g/ml)
1	s/grasas N	1.0996	19.80
1	s/grasas A	1.1016	21.0
1	s/sales N	1.0956	18.28
1	s/sales A	1.0652	17.09
1	Glicerina N	1.2784	46.37
1	Glicerina A	1.276	45.10
2	s/metanol	0.8272	9.07
2	s/grasas	1.1472	21.61
2	s/sales	1.1388	22.28
2	Glicerina	1.3036	47.15
3	s/metanol D	1.0496	10.80
3	s/metanol	1.05	11.70
3	Glicerina	1.2756	47.96

N = Neutro, A= Ácido, D= Diluido, s/= sin

*La concentración de glicerol fue medida para 2 g de muestra.

4.2 Proceso de Fermentación

4.2.1 Reproducción y Recolección de la Cepa

Inicialmente el hongo es proliferado en placas con PDA, de acuerdo a lo establecido en la metodología. Se realizaron resiembras una vez al mes para preservar la cepa, la Figura 4.4 representa el desarrollo de *A. niger* antes de realizarse una suspensión de esporas.

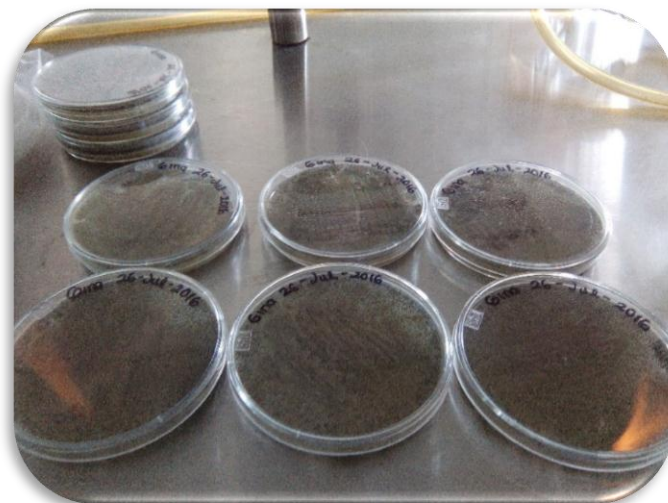


Figura 4.4. Placas inoculadas con *Aspergillus niger* en medio PDA.

Las esporas fueron recogidas por medio de la técnica de suspensión de esporas mencionada en el apartado de metodología; así mismo la solución fue analizada por medio de la cámara de Neubauer y con ayuda del microscopio para tener la contabilidad de la cantidad de esporas obtenidas de la proliferación y un mejor control de las esporas inyectadas en las fermentaciones. La suspensión fue almacenada en refrigeración hasta el momento en que se realizaba la inoculación en cada uno de los tratamientos y nuevamente puesta en refrigeración. La Figura 4.5 esquematiza las esporas visualizadas en el microscopio con la ayuda de la cámara de Neubauer que facilita el conteo de las esporas suspendidas.

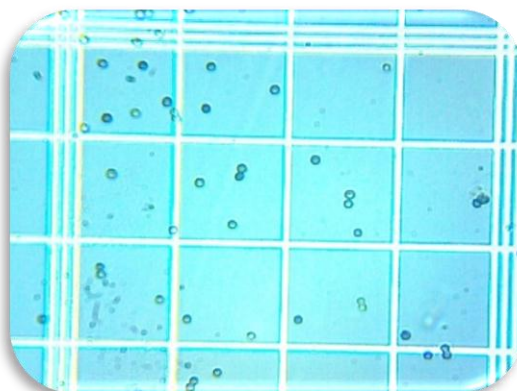


Figura 4.5. Esporas visualizadas al realizar el conteo en la cámara de Neubauer a través del lente 40X de un microscopio.

De acuerdo a la revisión de bibliografía se tomaron como antecedentes trabajos anteriores de fermentaciones donde se emplea a la cepa de *A. niger* para producir ácido cítrico con diferentes sustratos para poder hacer una asignación de límites inferior y superior de los nutrientes necesarios para el medio de cultivo, la Tabla 4.5 señala las variables independientes que se estipulan como fijas durante cada uno de los tratamientos y la Tabla 4.6 expone los límites seleccionados de los componentes para formular los medios a analizar así mismo de las condiciones de operación.

Tabla 4.5. Parámetros fijos del medio de fermentación.

Temperatura (°C)	30
pH	3
Esporas	2×10^6

Para la formulación de los medios de cultivo (Tabla 4.6) se tomó en cuenta la dextrosa suponiendo que *A. niger* lo emplee para su crecimiento y como fuente de carbono al glicerol para la producción del ácido.

Tabla 4.6. Rangos de condiciones de operación y nutrientes para la formulación de los tratamientos.

Variable (g/l)		Límite Inferior	Límite Superior
Fuente de Carbono	Glicerol	50	150
	Dextrosa	0	30
Fuente de Nitrógeno	Sulfato de Amonio	0	5
Fuente de Fosfato	Fosfato de Potasio	0	3
Fuente de Magnesio	Sulfato de Magnesio	0	0.7
Condición		Límite Inferior	Límite Superior
Condición de Operación	Agitación (rpm)	100	180
	Tiempo (días)	3	5

Este estudio destaca el beneficio ambiental al resolver la problemática de los productores de biodiesel al realizar un sondeo de los componentes y condiciones del proceso fermentativo y a su vez lograr una mayor producción de ácido cítrico con la cantidad óptima de nutrientes. El procedimiento se realizó en 2 etapas; en primer lugar, los componentes de los medios fueron seleccionados por el diseño de Plackett-Burman (DPB) para identificar los componentes significativos. En segundo lugar, la optimización de los componentes de los medios seleccionados se llevó a cabo de acuerdo con el diseño de caras centrales (DCC) para lograr un mayor rendimiento de ácido cítrico.

4.3 Glicerol Puro

Para salvaguardar la muestra cruda proporcionada, las pruebas bajo el diseño Plackett–Burman fueron realizadas con glicerol grado analítico, como un blanco para determinar las condiciones con las cuáles se deberá seguir con la investigación.

4.3.1 Primer Diseño Plackett-Burman

El diseño experimental Plackett-Burman 7/8 es empleado para evaluar el efecto conjunto de varios factores sobre una respuesta, principalmente se utiliza en el inicio del estudio experimental dado que aún no se conocen los factores que más influyen, su rango de influencia y las interacciones entre factores.

El propósito de esta técnica fue identificar los nutrientes significativos que tuvieron un impacto en la cantidad de producción de ácido cítrico en un número mínimo de experimentos.

El diseño de los 7 componentes con sus dos niveles (alto y bajo) para los medios evaluados en los 8 ensayos experimentales fue extraído del software llamado STATISTICA, mismo que se ilustra en la Tabla 4.7.

Tabla 4.7. Matriz del diseño experimental Plackett - Burman 7/8, primer estudio exploratorio.

# Tratamiento	Glicerol (g/l)	Dextrosa (g/l)	Sulfato de Amonio (g/l)	Fosfato de Potasio (g/l)	Sulfato de Magnesio (g/l)	Agitación (rpm)	Tiempo (días)
1	50.00	0.00	0.00	3.00	0.70	180.00	3.00
2	150.00	0.00	0.00	0.00	0.00	180.00	5.00
3	50.00	30.00	0.00	0.00	0.70	100.00	5.00
4	150.00	30.00	0.00	3.00	0.00	100.00	3.00
5	50.00	0.00	5.00	3.00	0.00	100.00	5.00
6	150.00	0.00	5.00	0.00	0.70	100.00	3.00
7	50.00	30.00	5.00	0.00	0.00	180.00	3.00
8	150.00	30.00	5.00	3.00	0.70	180.00	5.00
9 (C)	100.00	15.00	2.50	1.50	0.35	140.00	4.00
10	50.00	0.00	0.00	3.00	0.70	180.00	3.00
11	150.00	0.00	0.00	0.00	0.00	180.00	5.00
12	50.00	30.00	0.00	0.00	0.70	100.00	5.00
13	150.00	30.00	0.00	3.00	0.00	100.00	3.00
14	50.00	0.00	5.00	3.00	0.00	100.00	5.00
15	150.00	0.00	5.00	0.00	0.70	100.00	3.00
16	50.00	30.00	5.00	0.00	0.00	180.00	3.00
17	150.00	30.00	5.00	3.00	0.70	180.00	5.00
18 (C)	100.00	15.00	2.50	1.50	0.35	140.00	4.00

Después del tiempo estipulado para cada uno de los tratamientos se procedió a evaluar cada uno de ellos para así determinar el contenido de glicerol y dextrosa finales, la producción de ácido cítrico, la biomasa y el rendimiento, esto de acuerdo a la metodología propuesta para las cuantificaciones, se muestran los resultados de cada uno de los tratamientos planteados en la Tabla 4.8 además se incluye la respuesta del cambio de pH presentado durante la fermentación.

Tabla 4.8. Respuestas del Diseño Experimental Plackett - Burman 7/8 del primer estudio exploratorio.

# Tratamiento	Glicerol final (g/l)	Dextrosa final (g/l)	Ácido Cítrico (g/l)	Fracción de Consumo de Glicerol	Y p/s	Biomasa (g)	Δ pH
1	32.5625	0.0000	0.2324	0.3488	0.0133	0.2367	0.62
2	94.2131	0.0000	0.2402	0.3719	0.0043	0.2000	1.3
3	46.0267	31.3640	0.3816	0.0795	0.0960	0.3800	1.84
4	98.2248	22.5868	0.2716	0.3452	0.0052	0.5800	0.9
5	23.4290	0.0000	0.2324	0.5314	0.0087	0.2033	0.83
6	90.1105	0.0000	0.2128	0.3993	0.0036	0.4100	1.54
7	24.4956	15.8536	0.2088	0.5101	0.0082	0.4867	1.81
8	97.2059	10.3537	0.3973	0.3520	0.0075	1.3100	3
9 (C)	85.0860	7.6069	0.2363	0.1491	0.0158	1.1433	2.86
10	21.1031	0.0000	0.2402	0.5779	0.0083	0.1967	0.6
11	89.9029	0.0000	0.2481	0.4006	0.0041	0.1600	1.43
12	22.3745	14.5505	0.5072	0.5525	0.0184	0.3800	1.8
13	85.0844	19.6241	0.2599	0.4328	0.0040	0.4800	0.9
14	45.4419	0.0000	0.2167	0.0912	0.0475	0.1567	0.62
15	110.1118	0.0000	0.2167	0.2659	0.0054	0.4000	1.5
16	25.9254	17.3167	0.2206	0.4815	0.0092	0.4233	1.6
17	127.0174	15.6812	0.3148	0.1532	0.0137	1.1967	2.99
18 (C)	71.0287	10.5820	0.2324	0.2897	0.0080	0.8067	2.69

Haciendo una evaluación estadística del diseño para las variables dependientes de efecto relevante en cada uno de los tratamientos propuestos misma que se muestra en la Tabla 4.9, empleando de nueva cuenta el software de análisis. El cribado estadístico se basó en los principales efectos de los factores experimentales, pero no en sus efectos de interacción (Plackett & Burman, 1946).

Tabla 4.9. Estimación de los efectos sobre las respuestas ácido cítrico, fracción de consumo de glicerol y rendimiento producto-sustrato del diseño experimental Plackett - Burman 7/8, primer estudio exploratorio.

Respuesta	Glicerol	Dextrosa	Sulfato	Fosfato	Sulfato	Agitación	Tiempo
			de Amonio	de Potasio	de Magnesio		
Ácido Cítrico	0.6183	0.0008	0.0396	0.6535	0.0027	0.2277	0.0013
Valor P Consumo de Glicerol	0.5403	0.9125	0.6586	0.7548	0.5548	0.5005	0.2719
Y p/s	0.0667	0.4150	0.5402	0.6155	0.3632	00.1572	0.0988

Los factores que tiene un nivel por encima del 95% ($P < 0.05$) se consideran significativos (Montgomery, 2005) y se utilizaron para una optimización adicional donde en función del efecto se realiza una reformulación de los límites.

En el análisis en función de la producción de ácido cítrico las variables que mostraron relevancia fueron: dextrosa, la fuente de nitrógeno y la de magnesio además del tiempo, para todas las variables se arrojó en el efecto que causan que era necesario hacer un incremento de los límites a excepción de la fuente de nitrógeno donde se especifica lo contrario. De este modo al realizar el ajuste de los límites de los parámetros de interés, por lo que la Tabla 4.10 representa el cambio de rangos que ahora se empleará.

Tabla 4.10. Reformulación de los límites de evaluación de los factores del diseño experimental Plackett – Burman 7/8 del primer estudio exploratorio.

Factor	Lím. Mín.	Lím. Máx.	Efecto	Lím. Mín.	Lím. Máx.
Glicerol	50	150	-0.009814	50	130
Dextrosa	0	30	0.090285	20	70
Sulfato de Amonio	0	5	-0.045142	0	3
Fosfato de Potasio	0	3	-0.008832	0	2.5
Sulfato de Magnesio	0	0.7	0.075564	0	1
Agitación	100	180	-0.024534	100	160
Tiempo	3	5	0.084396	5	10

En función de los efectos que causan las variables independientes se realizó un ajuste en sus límites, para la dextrosa y el tiempo ambos limites fueron aumentados, el límite superior de la fuente de N fue disminuida y el límite superior de la fuente de Mg fue aumentado también. Para las fuentes de nitrógeno, fosfato y magnesio los limites inferiores no se modifican para tomar en consideración si inclusive no son necesarios en los medios.

La agitación y tiempo de duración del medio del cultivo es un factor importante para el desarrollo del microorganismo, maduración y formación de pellets, lo cual puede ser observado en la Figura 4.6 en donde se puede comparar como además de estos factores la composición del medio también proporciona una coloración diferente a los medios. A una mayor velocidad de agitación la formación de pequeños pellets (esféricos) es comparado que a una velocidad menor solo se forma una capa micelial.



1-10 * 180 rpm 3 d



2-11 * 180 rpm 5 d



7-16 * 180 rpm 3 d



8-17 * 180 rpm 5 d



6-15 * 100 rpm 3 d



5-14 * 100 rpm 5 d



4-13 * 100 rpm 3 d



3-12 * 100 rpm 5 d



9-18 * 140 rpm 4 d

*Número de tratamiento, agitación y tiempo.

Figura 4.6. Medios de cultivo del primer diseño Plackett-Burman al final de su tiempo de fermentación.

4.3.2 Segundo Diseño Plackett-Burman

Empleando la base del diseño previo, solamente ahora usando los nuevos rangos de exploración y realizando la cuantificación para el análisis se obtiene la tabla de respuestas de los nuevos tratamientos formulados misma que se presenta a continuación.

Tabla 4.11. Respuestas del Diseño Experimental Plackett - Burman 7/8 para el segundo estudio exploratorio.

# Tratamiento	Glicerol final (g/l)	Dextrosa final (g/l)	Ácido Cítrico (g/l)	Fracción de Consumo de Glicerol	Y p/s	Biomasa (g)	Δ pH
1	28.1178	12.8618	0.3305	0.4376	0.0151	0.2033	0.13
2	109.3559	18.2101	0.2716	0.1588	0.0132	0.4467	1.66
3	45.6242	72.5897	0.6720	0.0875	0.1536	0.5133	-0.35
4	104.7476	66.2130	0.3148	0.1942	0.0125	0.3367	-1.23
5	50.6974	12.2255	0.2795	-0.0139	-0.4008	0.5433	-0.13
6	111.8304	17.4269	0.4247	0.1398	0.0234	0.5517	-0.36
7	37.3788	62.8868	0.3187	0.2524	0.0253	0.2267	0.11
8	107.9776	31.9628	0.3344	0.1694	0.0152	1.1800	2.71
9 (C)	79.7078	35.9390	0.4247	0.1144	0.0413	1.5833	1.62
10	42.5161	19.9133	0.3227	0.1497	0.0431	0.3600	0.07
11	91.1645	13.3285	0.2638	0.2987	0.0068	0.3800	1.67
12	47.6647	74.5840	0.6642	0.0467	0.2844	0.5667	-0.49
13	103.9191	65.4408	0.2402	0.2006	0.0092	0.3133	-1.28
14	46.1453	1.5826	0.2834	0.0771	0.0735	0.8700	0.24
15	114.2266	18.2275	0.5150	0.1213	0.0327	0.4433	-0.38
16	26.0575	42.9204	0.2991	0.4789	0.0125	0.1933	0.36
17	94.2808	26.9792	0.3384	0.2748	0.0095	1.1200	2.71
18 (C)	81.3547	36.6149	0.2873	0.0961	0.0332	1.4767	1.59

Para el tratamiento 5 surgieron las respuestas de fracción de consumo de glicerol y a su vez del rendimiento como negativos, a razón de que la cuantificación de glicerol al

final de fermentación fue mayor que la añadida al inicio, se asume a un error de evaluación de la muestra para dicho factor. También se pueden detallar que en los cambios del pH muchos datos son negativos, en estos medios el hongo presencié su propio reajuste de pH adjudicándose el hecho a que su pH interno se vio afectado por las condiciones ácidas del medio generando fallos en su capacidad acidófila.

La evaluación de este diseño de cribado muestra que los nuevos límites impuestos afectaron de manera negativa los resultados del análisis de los parámetros como puede ser visto en la Tabla 4.12, donde nuevamente los factores que tiene un nivel por encima del 95% ($P < 0.05$) se consideran significativos.

Tabla 4.12. Estimación de los efectos sobre las respuestas ácido cítrico, fracción de consumo de glicerol y rendimiento producto-sustrato del diseño experimental Plackett - Burman 7/8, segundo estudio exploratorio.

	Respuesta	Glicerol	Dextrosa	Sulfato de Amonio	Fosfato de Potasio	Sulfato de Magnesio	Agitación	Tiempo
	Ácido Cítrico	0.0173	0.0135	0.1112	0.0001	0.0000	0.0002	0.0640
Valor P	Consumo de Glicerol	0.9461	0.4409	0.8833	0.8444	0.5721	0.0070	0.0570
	Y p/s	0.0057	0.0465	0.0315	0.0223	0.0120	0.0089	0.0200

Para este caso el número de factores significativos aumentó, por lo que automáticamente observamos que algunos de los cambios no fueron certeros. Una de las principales observaciones fue que el aumento de dextrosa hace que la cepa no consuma al glicerol primordialmente, entonces, se tomó la decisión de eliminar la presencia de éste azúcar en la siguiente secuencia de la investigación.

La Figura 4.7 representa los medios de fermentación de la segunda etapa del diseño Plackett-Burman donde se puede apreciar un caldo siendo mucho más denso y de coloración más ligera y que no existe la pelletización que se vio formada a una agitación de 180 rpm de la del diseño anterior. Entonces se deduce que la agitación es la causante de la morfología adoptada por *A. niger*.



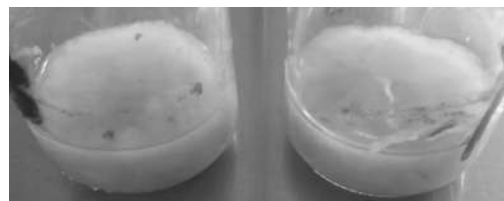
1-10 * 160 rpm 5 d



2-11 * 160 rpm 10 d



7-16 * 160 rpm 5 d



8-17 * 160 rpm 10 d



6-15 * 100 rpm 5 d



5-14 * 100 rpm 10 d



4-13 * 100 rpm 5 d



3-12 * 100 rpm 10 d



9-18 * 130 rpm 7.5 d

*Número de tratamiento, agitación y tiempo.

Figura 4.7. Medios de cultivo del segundo diseño Plackett-Burman al final de su tiempo de fermentación.

En la Figura 4.8 se presenta en gráfico obtenido de la fracción de consumo del glicerol en los dos DPB, haciendo la comparativa entre los dos ensayos se advierte

notablemente que en el segundo ensayo el consumo decrece, esto se atribuye a que el sustrato consumido es el azúcar y no el glicerol.

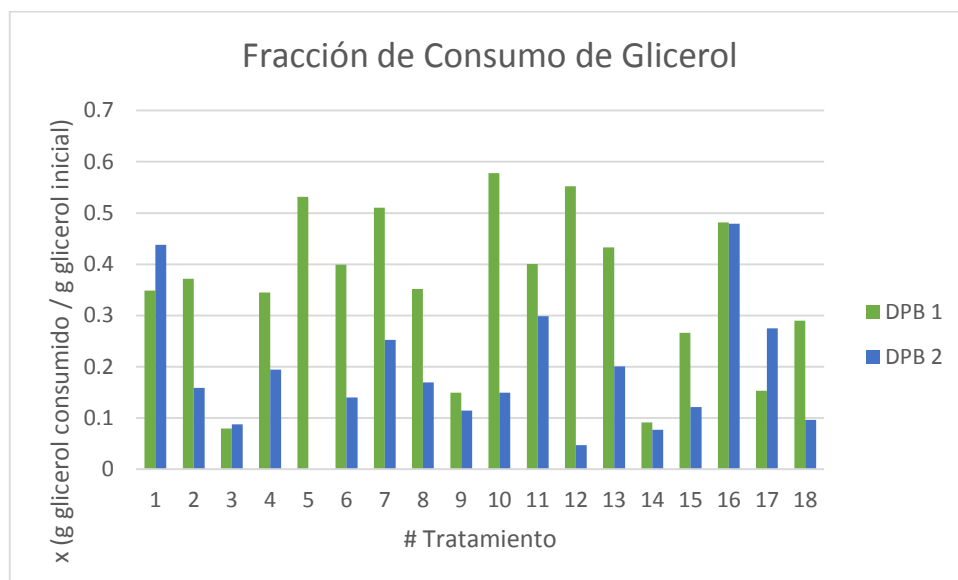


Figura 4.8. Comparativa entre la fracción de consumo de los dos diseños Plackett-Burman.

Como un apartado de la investigación, se hizo una prueba dónde manejando las cepas *CMU 126-13* (cepa sin identificar), *CMU 159-13 - A. oryzae*, *CMU 181-13 - A. flavus*, *A.sp.*, *COMC Cepa s/identificar aislada del Lago de Zirahuén* y *A. niger*; bajo las mismas condiciones y composición de medio de fermentación comprobar que la elección de la cepa para este proyecto fuera la adecuada, obteniéndose como resultado que a pesar de que algunas de las cepas tuvieron resultados satisfactorios para la asimilación de glicerol como sustrato y otras una similar a la de *Aspergillus niger* lo que nos llevó a continuar con ésta cepa fue que el rendimiento producto–sustrato fue el mejor de todos los casos como se muestra en la Tabla 4.13. Además, teníamos que tener muy en cuenta que algunos de los microorganismos tenían carácter patógeno y dificultaba su manipulación, la Figura 4.9 esquematiza como fue el desarrollo de los diferentes microorganismos en los medios de cultivo.

Tabla 4.13. Rendimientos obtenidos con diferentes microorganismos.

Microorganismo	Y p/s
CMU 126-13	0.0082
CMU 159-13 - <i>A. Oryzea</i>	0.0053
CMU 181-13 - <i>A. Flavus</i>	0.0047
<i>A.SP.</i>	0.0102
<i>A. Niger</i>	0.0117
COMC Cepa s/identificar aislada del Lago de Zirahuén	0.012



Figura 4.9. Crecimiento de diferentes cepas en el mismo medio de cultivo.

Una vez identificados los factores importantes se investigan con mayor detalle en el experimento posterior.

4.3.3 Crecimiento, Consumo y Producción de Ácido Cítrico con Glicerol Analítico

Para realizar la cinética de *A. niger* se empleó la siguiente composición del medio: Glicerol 150 (g/l), sulfato de amonio 1.5 (g/l), fosfato de potasio 1.25 (g/l), Sulfato de magnesio 0.35 (g/l); a una agitación de 100 rpm. El argumento que se manejó para

determinar estos valores son en función a los resultados de los diseños DPB1 y DPB2, donde los mejores resultados se encontraron con la fuente de N en un rango de 0-3 g/l para la fuente de fosfato se registraba ser necesario emplear un valor menor del límite superior de DPB1 que era de un valor de 3, pero en cuanto a la fuente de Mg si aumentaba el límite superior afecta la respuesta por lo que se debía incluir un dato reducido que el del límite superior del diseño DPB1.

En la Figura 4.10 se detalla cómo son las curvas generadas de este ensayo. La variación del pH en la cinética se puede apreciar que en los primeros 10 días decrece, sin embargo, después de este período se mantiene constante; los antecedentes mencionan que durante la producción de ácido cítrico el valor del pH decae como parte del metabolismo del hongo.

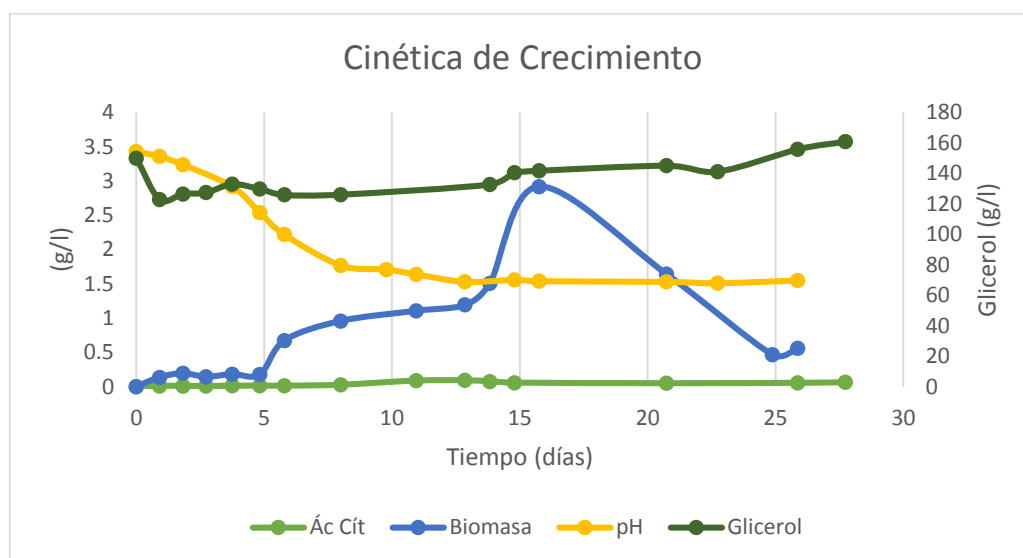


Figura 4.10. Curvas de Crecimiento, Consumo Producción de *A. niger*.

El crecimiento del microorganismo tiene la forma de crecimiento convencional de las cepas de *Aspergillus*, con la excepción de que existe un punto máximo. Entre los días 14 y 20 de la fermentación se presencié la formación de esporas en los medios, las cuáles fueron en aumento hasta que se desarrollaron y se formó nuevo micelio, este punto máximo se puede aludir a este hecho.

La Figura 4.13 esquematiza gráficamente como fue el crecimiento del microorganismo.

Analizando por separado la generación de ácido cítrico se tiene la Figura 4.11, es notable observar que la producción es baja y que en el día 12 se tiene una generación de 0.0907 g/l de ácido cítrico y después del día 15 se mantiene casi constante.

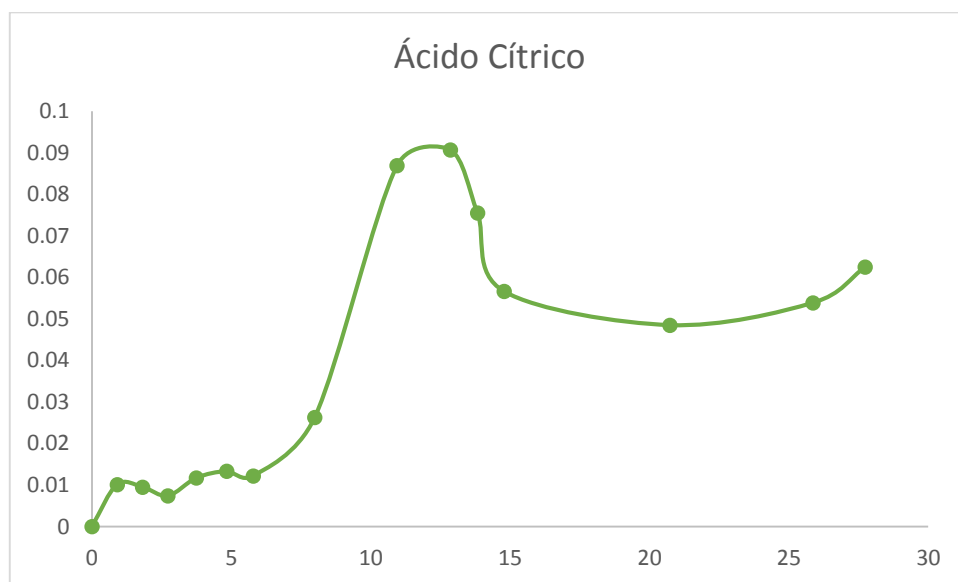


Figura 4.11. Curva de producción de ácido cítrico.

El consumo de glicerol es un caso de interés al notar el tipo de curva que presenta, sin embargo, al comparar esta curva con la dada por Rywinska y Rymowicz (2009) (Figura 4.12 donde emplean a la levadura *Y. Lipolytica Wratislavia* con diferentes muestras de glicerol en un lapso de 120 horas es incuestionable que el consumo de glicerol es similar en los primeros 5 días de nuestro estudio.

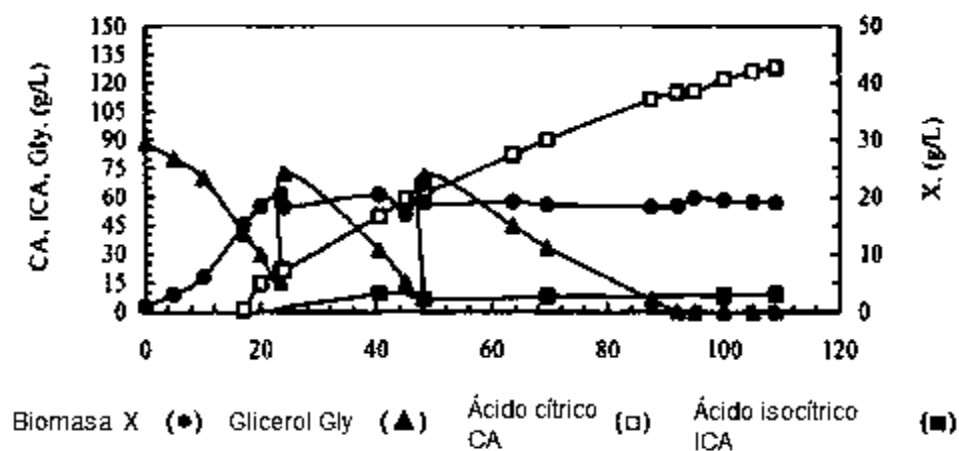


Figura 4.12. Cinética presentada por Rywinska y Rymowicz (2009) *Y. Lipolytica Wrarislavia*.



Figura 4.13. Crecimiento y morfología de *Aspergillus niger* durante el seguimiento de su cinética.

4.4 Glicerol Residual

A partir de los resultados presentados en la Tabla 4.4, tomando en consideración la cantidad de impurezas removidas y de glicerol en los diferentes casos se considera que la glicerina final del caso 3 es la mejor muestra para continuar con las pruebas de

investigación. Además, en función de que algunas cepas de *A. niger* han producido una gran cantidad de ácido oxálico a partir de lípidos a un pH entre 4 y 5 (Musial & Rymowicz 2009) que sustentan nuestra decisión de emplear dicha muestra se procede a hacer una prueba inicial y así verificar el consumo de glicerol como de las demás variables de respuesta. Dicha prueba se reporta en la Tabla 4.14 donde se aprecia el aumento de la cantidad de ácido cítrico producido como un buen consumo de sustrato.

Tabla 4.14. Ensayo preliminar de fermentación con muestra cruda.

Medio de Cultivo							
# Caso	Etapa	Glicerol (g/l)	Sulfato de Amonio (g/l)	Fosfato de Potasio (g/l)	Sulfato de Magnesio (g/l)	Agitación (rpm)	Tiempo (días)
3	Glicerina	47.96	1.50	1.25	0.50	100.00	7.80

Variables de Respuesta							
# Caso	Etapa	Glicerol final (g/l)	Ácido Cítrico (g/l)	Fracción de Consumo de Glicerol	Y p/s	Biomasa (g)	Δ pH
3	Glicerina	22.0228	0.3501	0.5408	0.0135	0.3355	2.2

Entonces se procede con un planteamiento de un nuevo diseño donde gracias a los ensayos previos se han dejado de lado las variables como la agitación, el tiempo, el azúcar y el glicerol; nos enfocaremos en los nutrientes que al parecer tienen gran efecto sobre la fermentación que son el sulfato de amonio, el fosfato de potasio y el sulfato de magnesio.

4.4.1 Diseño Experimental de Compuesto Central

Después de la evaluación y selección de los componentes de los medios por el método de PBD, se llevó a cabo utilizando DCC bajo la metodología de superficie de respuesta. Así explicar las relaciones entre una serie de factores experimentales y la respuesta. Además, se podrían identificar las condiciones óptimas de los factores experimentales que permitirían obtener mayores rendimientos para la respuesta. El DCC consiste en un punto factorial 2^n con $2n$ puntos axiales y puntos centrales de C , como se explica en la siguiente ecuación:

$$\# \text{ Experimentos} = 2^n + 2n + C$$

Donde n es el número de factores estudiados (en nuestro caso tres) para la optimización y C es el número de repeticiones de experimentos en los puntos centrales (dos).

Los componentes de los medios evaluados de los diseños DPB1 y DPB2 que tuvieron un efecto significativo en la producción de ácido cítrico se optimizaron usando DCC para lograr el rendimiento máximo. La matriz DCC de los 3 componentes seleccionados que fueron la fuente de N (sulfato de amonio), la fuente de P (fosfato de potasio) y la fuente de Mg (sulfato de magnesio) dado que la dextrosa fue descartada al final de la comparativa de los diseños DPB 1 y 2 y la agitación fue determinada en el estudio del cribado al observar la morfología y descubrir que las agitaciones vigorosas provocaban pelletización, la cual genera un estrés en el microorganismo y disminuye la productividad. El tiempo fue determinado con la cinética de crecimiento dónde se observa que la máxima productividad se presentó en el día 12, sin embargo, el crecimiento, el pH y consumo de glicerol brindan mejores respuestas en un lapso de entre el 5° y 10° día, entonces considerando un proceso que se pudiera escalar un óptimo manejo en dicha industria es de alrededor de 7 días, dato que es tomado para la optimización. Entonces al tener 3 factores tendremos un total de 16 experimentos, mismos que son representados en la Tabla 4.15.

Tabla 4.15. Diseño de Compuesto Central y sus Respuestas.

# Tratamiento	Sulfato de Amonio	Fosfato de Potasio	Sulfato de Magnesio	Ácido Cítrico	Frac. Consumo de Glicerol	Y p/s	Biomasa
1	1.5	1.5	0.35	0.0501	0.1568	0.0048	0.3897
2	0	0	0.7	0.287	0.0206	0.1967	0.4417
3	0	3	0.7	0.2037	0.2945	0.0088	0.5757
4	1.5	1.5	0.7	0.0257	0.2062	0.0018	0.3263
5	3	1.5	0.35	0.0431	0.1416	0.0045	0.4363
6	3	3	0	0.1448	0.4847	0.0042	0.975
7	1.5	1.5	0	0.0436	0.0088	0.0697	0.2983
8	3	0	0.7	0.1026	0.2032	0.0068	0.8823
9	0	0	0	0.1794	0.2063	0.0111	0.6777
10	3	3	0.7	0.1345	0.2164	0.0085	0.7997
11	0	1.5	0.35	0.1588	-0.0707	-0.034	0.183
12	1.5	3	0.35	0.0333	0.1073	0.0047	0.3407
13	0	3	0	0.1583	0.1467	0.0143	0.6997
14	3	0	0	0.1767	0.0419	0.077	0.5547
15	1.5	0	0.35	0.0485	0.0518	0.0146	0.4253
16	1.5	1.5	0.35	0.0501	0.1568	0.0048	0.3897
17	1.5	1.5	0.35	0.0642	0.1272	0.0077	0.3787
18	0	0	0.7	0.2513	0.1541	0.0228	0.45
19	0	3	0.7	0.161	0.1229	0.0172	0.702
20	1.5	1.5	0.7	0.0322	0.0247	0.0224	0.337
21	3	1.5	0.35	0.0268	0.0765	0.0055	0.8757
22	3	3	0	0.1134	0.4967	0.0032	0.7753
23	1.5	1.5	0	0.0312	0.0571	0.0079	0.2747
24	3	0	0.7	0.1691	0.1593	0.0148	0.7737
25	0	0	0	0.2762	0.139	0.0254	0.4613
26	3	3	0.7	0.1415	0.292	0.0063	1.2717
27	0	1.5	0.35	0.1599	-0.0307	-0.078	0.188
28	1.5	3	0.35	0.0387	0.1614	0.0038	0.3497
29	0	3	0	0.1659	0.1326	0.0166	0.6947
30	3	0	0	0.2227	0.4487	0.0067	0.5257
31	1.5	0	0.35	0.0458	0.1279	0.0052	0.3403
32	1.5	1.5	0.35	0.0642	0.1272	0.0077	0.3787

Las respuestas para cada uno de los tratamientos se representan también en la Tabla 4.15, 15 tratamientos estipulados para el diseño, se agregaron también los resultados de las réplicas.

Los resultados se analizaron con el Software de STATGRAPHICS Centurion XVI.I. La tabla ANOVA (Tabla 4.16) fragmenta la variabilidad de ácido cítrico en piezas separadas para cada uno de los efectos. En este caso, 4 efectos tienen un valor P menor que 0.05, indicando que son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95.0%; el diseño fue significativo para el factor de sulfato de amonio y el factor fosfato de potasio.

Tabla 4.16. ANOVA para el modelo cuadrático de superficie de respuesta.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón F	Valor P
A:Sulfato de Amonio	0.0263756	1	0.0263756	21.69	0.0001
B:Fosfato de Potasio	0.0107741	1	0.0107741	8.86	0.0072
C:Sulfato de Magnesio	6.48E-07	1	6.48E-07	0	0.9818
AA	0.0435271	1	0.0435271	35.79	0
AB	0.0017661	1	0.0017661	1.45	0.2416
AC	0.00339598	1	0.00339598	2.79	0.1096
BB	0.00656388	1	0.00656388	5.4	0.0303
BC	0.00066693	1	0.00066693	0.55	0.4672
CC	0.00381051	1	0.00381051	3.13	0.0912
bloques	0.00047973	1	0.00047973	0.39	0.5368
Error total	0.0255415	21	0.00121626		
Total (corr.)	0.191848	31			

R-cuadrada = 86.6866 porciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 80.3469 porciento

El estadístico R^2 proporciona un indicador para la variabilidad de la respuesta predicha con los resultados experimentales, cuanto más cerca está R^2 de 1, mejor será el modelo para predecir la respuesta. El modelo, así ajustado, explica 86.6866% de la

variabilidad en AC. El estadístico R^2 ajustado, es 80.3469%, lo que confirma que el modelo era altamente significativo. Entonces, esto confirma el posible uso del modelo polinomial desarrollado para navegar por el espacio de diseño.

El modelo de regresión cuadrática al que se ajustan a los datos es el presentado a continuación:

$$\begin{aligned} \text{Ác Cítrico} = & 0.238367 - 0.142645 * A - 0.0738253 * B - 0.130951 * C \\ & + 0.0403812 * A^2 + 0.00466944 * A * B - 0.02775 * A * C + 0.0156812 \\ & * B^2 + 0.0122976 * B * C + 0.219451 * C^2 \end{aligned}$$

Donde:

$A = \text{Sulfato de Amonio}$

$B = \text{Fosfato de Potasio}$

$C = \text{Sulfato de Magnesio}$

Al observar el ANOVA para los resultados dados, el significado para cada uno de los coeficientes del parámetro del modelo se evaluó utilizando la prueba F y los valores de P. Se observó que las variables con efectos altamente significativos fueron los términos lineales de la fuente de nitrógeno (A) y de la fuente de fosfato (B) así como también sus correspondientes términos cuadráticos.

El gráfico de Pareto (Figura 4.14) muestra cada uno de los efectos estimados en orden decreciente de importancia. La longitud de cada barra es proporcional al efecto estandarizado, el cual es el efecto estimado dividido entre su error estándar. En este caso, 4 efectos son significativos como ya se mencionaba con anterioridad en la tabla del ANOVA.

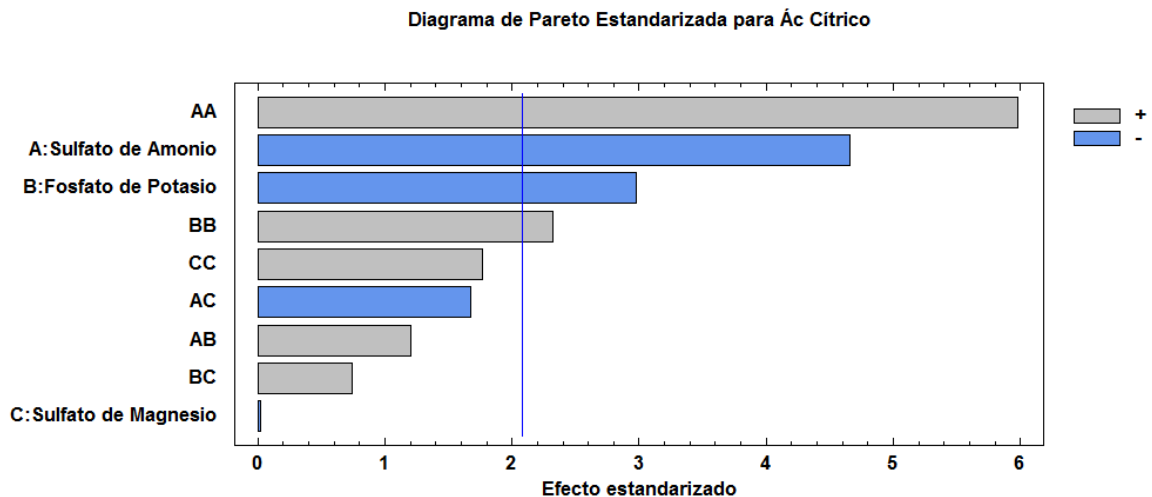
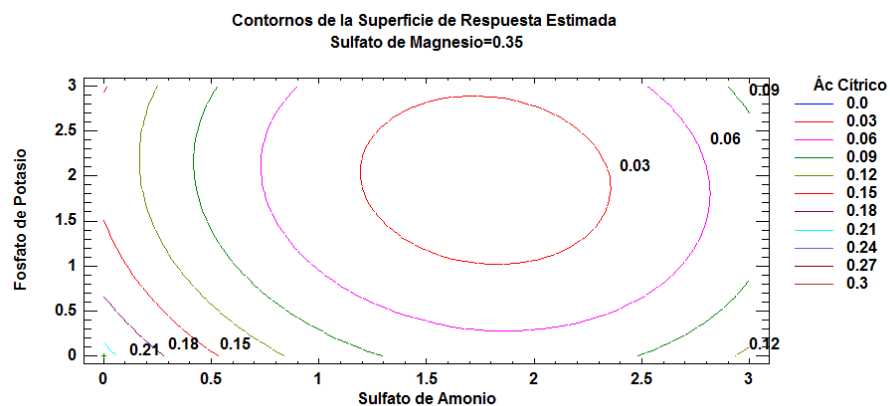
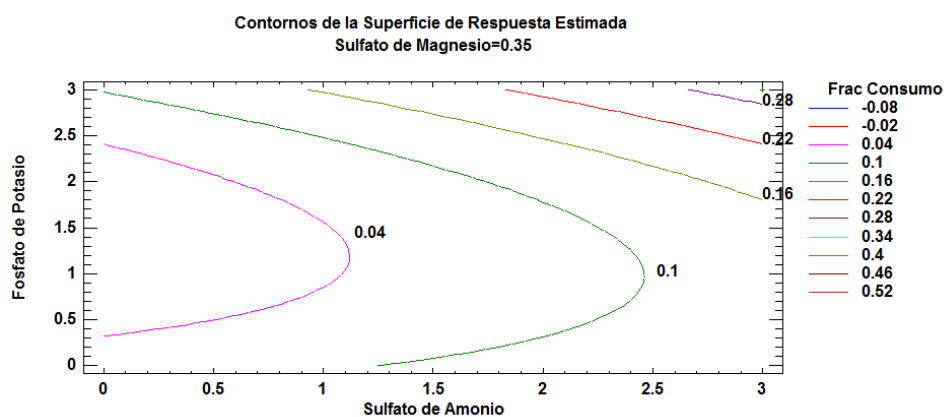


Figura 4.14. Diagrama de Pareto estandarizada para AC.

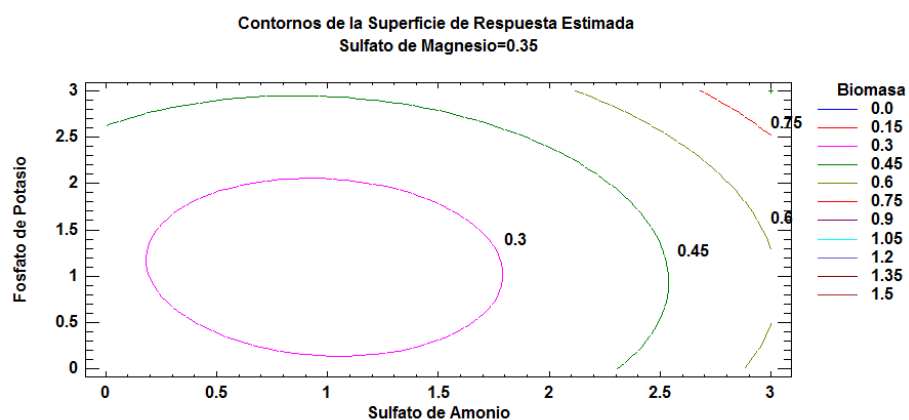
Al ser las fuentes de nitrógeno y de fosfato las más importantes del proceso, son sus efectos los que se grafican para tener un amplio panorama, al graficar las líneas de contorno de las respuestas en función de dichas variables se puede apreciar que a mayor concentración de ambos nutrientes las respuestas mejoran notablemente, sin embargo, existe la disyuntiva en cuanto a qué dichos compuestos sean también transformados por el microorganismo en la misma biomasa, la gráfica c) de la Figura 4.15 nos genera dicha discusión al contraponerla con las gráficas a) y b) (respuestas para ácido cítrico y consumo de glicerol respectivamente). Entonces, el nitrógeno parecía desempeñar un papel importante en el metabolismo del ácido cítrico. La célula necesita nitrógeno en forma de amonio para formar sustancias celulares. Por otra parte, una alta concentración de nitrógeno parece inhibir la producción de ácido cítrico, ya que mejoraría la célula para crecer y producir biomasa en lugar de producir ácido cítrico como lo mencionan Wieczorek & Brauer en su trabajo.



a)



b)



c)

Figura 4.15. Líneas de contorno de la superficie de respuesta estimada (Sulfato de Amonio contra Fosfato de Potasio). a) Ácido cítrico, b) Fracción de consumo de glicerol y c) Biomasa.

También se consideraron nutrientes potenciadores del crecimiento, y parecen tener un efecto notable durante el crecimiento de *A. niger* y su actividad metabólica durante la fermentación (Imandi, Bandaru, Somalanka, Bandaru & Garapati, 2008; Singh & Dikshit, 2010). Además, se considera como un agente tampón, ya que actúa para mantener el pH en un valor deseado, por lo que debe utilizarse en una cantidad razonable para mantener el pH del sustrato dentro del intervalo deseado. El magnesio afecta la tasa de utilización de azúcar por la célula, relacionada con el aumento del peso micelial (aumento de la biomasa) por lo que este parámetro debe ser limitado para estimular el hongo a producir ácido cítrico en lugar de crecimiento.

Al realizarse la optimización de las múltiples respuestas se determinó la combinación de los factores experimentales que simultáneamente optimizan las respuestas. Maximizando la función de “deseabilidad” con la salida evaluada en cada punto del diseño, tenemos los valores mostrados en la Tabla 4.17. Entre los puntos de diseño, se tiene que la ‘deseabilidad’ máxima se alcanza en el tratamiento número 6.

Tabla 4.17. Deseabilidad Prevista y Observada de cada uno de los tratamientos.

# Tratamiento	Ácido Cítrico	Frac Consumo	Y p/s	Biomasa	Deseabilidad	
					Prevista	Observada
1	0.0501	0.1568	0.0048	0.3897	0.0000	0.2151
2	0.2870	0.0206	0.1967	0.4417	0.4574	0.4422
3	0.2037	0.2945	0.0088	0.5757	0.4264	0.4727
4	0.0257	0.2062	0.0018	0.3263	0.2028	0.0000
5	0.0431	0.1416	0.0045	0.4363	0.2769	0.2042
6	0.1448	0.4847	0.0042	0.9750	0.5483	0.5581
7	0.0436	0.0088	0.0697	0.2983	0.1950	0.1529
8	0.1026	0.2032	0.0068	0.8823	0.4377	0.4096
9	0.1794	0.2063	0.0111	0.6777	0.4210	0.4535
10	0.1345	0.2164	0.0085	0.7997	0.4781	0.4402
11	0.1588	-0.0707	-0.0344	0.1830	0.1992	0.0000
12	0.0333	0.1073	0.0047	0.3407	0.1715	0.1412
13	0.1583	0.1467	0.0143	0.6997	0.3932	0.4196
14	0.1767	0.0419	0.0770	0.5547	0.4807	0.3855
15	0.0485	0.0518	0.0146	0.4253	0.2371	0.1939
16	0.0501	0.1568	0.0048	0.3897	0.0000	0.2151
17	0.0642	0.1272	0.0077	0.3787	0.0752	0.2317
18	0.2513	0.1541	0.0228	0.4500	0.4657	0.4188
19	0.1610	0.1229	0.0172	0.7020	0.4239	0.4133
20	0.0322	0.0247	0.0224	0.3370	0.2219	0.1212
21	0.0268	0.0765	0.0055	0.8757	0.2715	0.1205
22	0.1134	0.4967	0.0032	0.7753	0.5441	0.4819
23	0.0312	0.0571	0.0079	0.2747	0.2140	0.1057
24	0.1691	0.1593	0.0148	0.7737	0.4374	0.4493
25	0.2762	0.1390	0.0254	0.4613	0.4217	0.4296
26	0.1415	0.2920	0.0063	1.2717	0.4662	0.5429
27	0.1599	-0.0307	-0.0779	0.1880	0.2057	0.0000
28	0.0387	0.1614	0.0038	0.3497	0.2059	0.1745
29	0.1659	0.1326	0.0166	0.6947	0.3858	0.4199
30	0.2227	0.4487	0.0067	0.5257	0.4789	0.5086
31	0.0458	0.1279	0.0052	0.3403	0.2493	0.1852
32	0.0642	0.1272	0.0077	0.3787	0.0752	0.2317

A partir de que el valor óptimo es igual a 0.546798 (señalado con anterioridad) se tiene que la Tabla 4.18 muestra la combinación de niveles de factores que maximiza la función de ‘deseabilidad’ en la región indicada. También muestra la combinación de factores a la cual se alcanza el valor óptimo para cada una de la respuesta del diseño.

Tabla 4.18. Optimización de la Deseabilidad.

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Sulfato de Amonio	0	3	3
Fosfato de Potasio	0	3	3
Sulfato de Magnesio	0	0.7	0

Respuesta	Óptimo
Ácido Cítrico	0.135542
Frac Consumo	0.419826
Y p/s	0.0342545
Biomasa	0.838692

En función de la optimización de la deseabilidad se grafica la superficie y los contornos de la respuesta estimada (Figura 4.16) de los factores que más repercutieron en el diseño, manteniendo el factor restante en su valor medio. La altura de la superficie representa los valores de deseabilidad. En la Figura 4.15. a) se aprecia la formación de una convexidad entre los puntos del sulfato de amonio de 1.2 a 2.4 y del fosfato de potasio entre los puntos 1 a 2.7, sin embargo, del punto mayor del fosfato se observa el incremento en la deseabilidad y de la fuente de nitrógeno a partir del punto 2.7. La misma funcionalidad se puede apreciar en el gráfico b la de misma figura, en donde exactamente se observa el área con la menor deseabilidad del diseño. Si se ubica en los puntos óptimos obtenidos se alcanza una deseabilidad de aproximadamente 0.4.

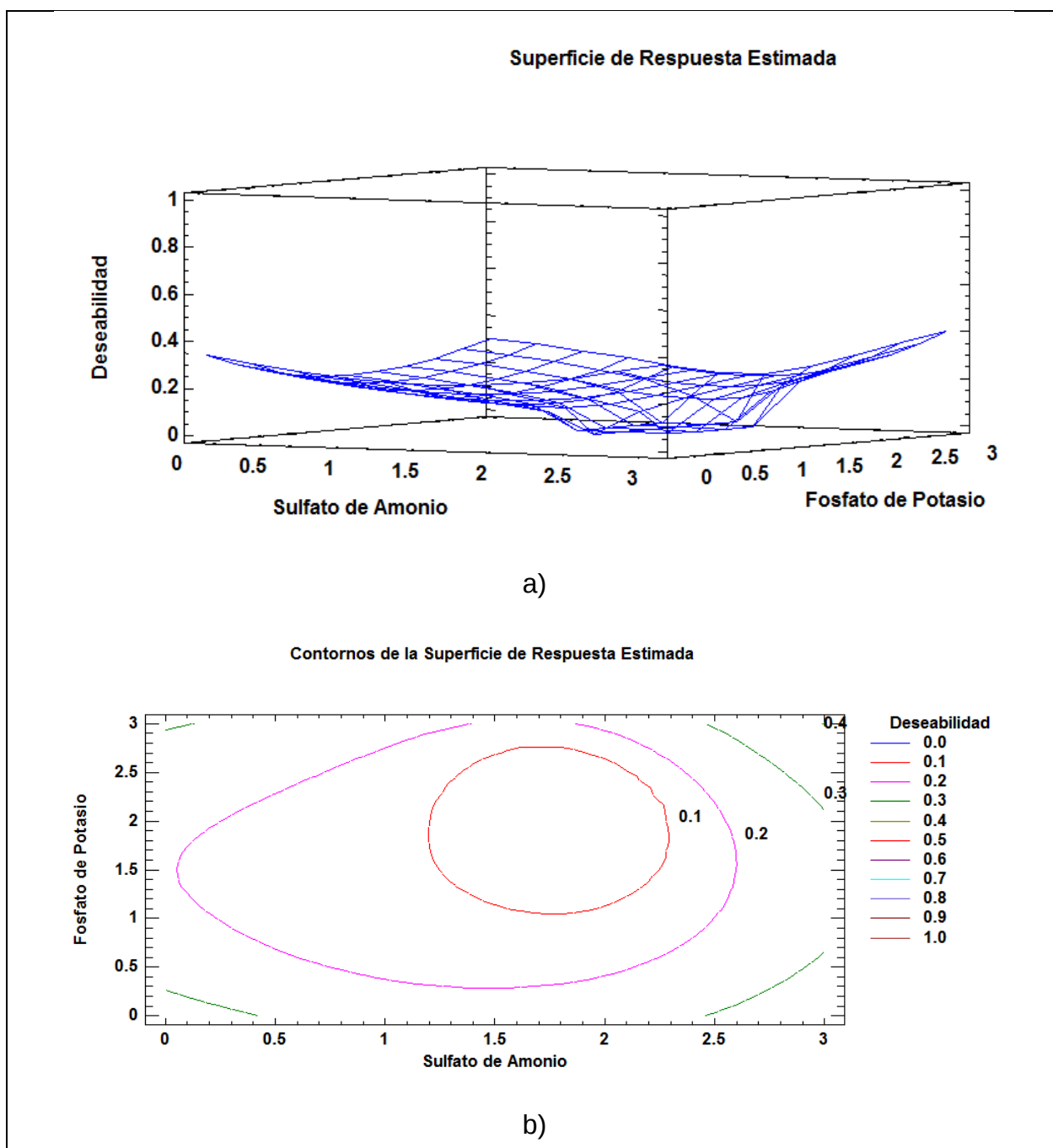


Figura 4.16. Gráfica de Superficie (a) y de contorno (b) de respuesta de la optimización de las múltiples respuestas.

Visualizando los caldos de cultivo finales, podemos concluir también que la pigmentación de cada medio es de acuerdo a los nutrientes contenidos en él. Una coloración de amarillo a naranja claro se presenta cuando existe una cantidad alta de la

fuelle de nitr3geno, as3 como el fosfato en los medios generan una soluci3n de un color blanquecino-lechoso y se atribuye al sulfato de magnesio una formaci3n uniforme del microorganismo dado que en los medios en lo que 3ste elemento se encontraba en mayor proporci3n su forma de crecimiento era en forma de filamentos o conjuntos miceliales. La forma de crecimiento de los diferentes tratamientos se puede apreciar en la Figura 4.17.

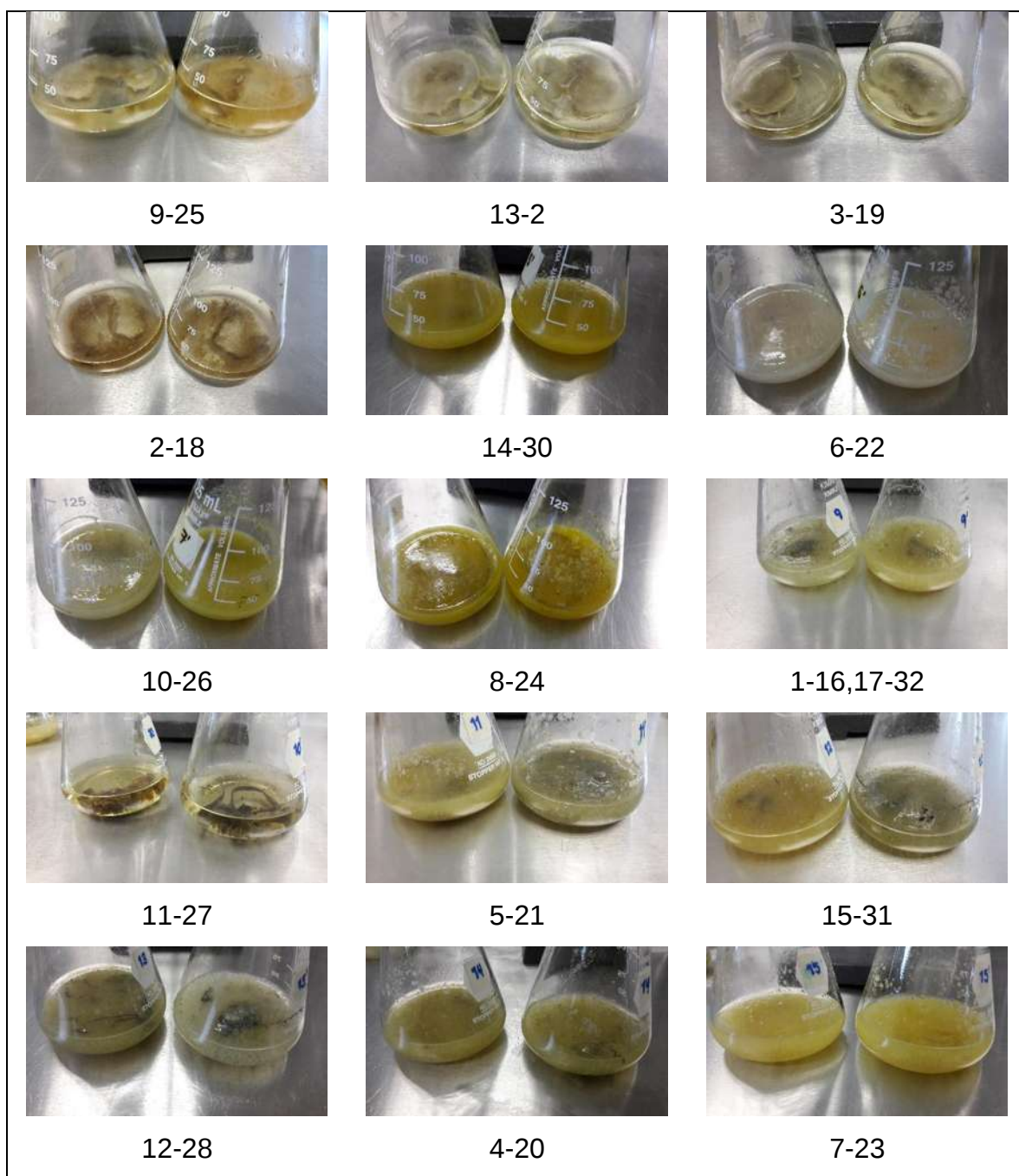


Figura 4.17. Crecimiento de *A. niger* en los medios formulados por DCC.

CONCLUSIONES

El glicerol residual es un sustrato adecuado para la biosíntesis del metabolito ácido cítrico y para el crecimiento de *Aspergillus niger* debido a su composición, que aporta condiciones nutricionales al microorganismo.

El glicerol proveniente de los aceites de desecho es la muestra que, en el proceso de purificación, la remoción de impurezas fue con mayor medida. Además de contener el mejor contenido de glicerol con 47.96 g/l.

La agitación que mejor consistencia proporcionó a los medios de cultivo además de otorgar una morfología adecuada para el microorganismo, fue a 100 rpm. El tiempo evaluado para la producción de ácido cítrico, donde el crecimiento y el consumo de glicerol presentan mejores respuestas en los ensayos es a los 7 días.

La composición del medio que proporciona los mejores resultados es con la concentración de sulfato de amonio de 3 g/l, fosfato de potasio con 3 g/l y sin la presencia de la fuente de magnesio; con un 41.98% de consumo del glicerol 0.1355 g/l de ácido cítrico.

La mayor producción de metabolito reportada fue de 0.2716 g/l con un consumo de glicerol de 34.52% en DPB1, 0.3148 g/l con 19.42% de glicerol consumido en DPB2 y en DCC 0.2227 g/l de ácido cítrico producido con el consumo de 44.87% de glicerol residual.

Se puede concluir entonces que **el glicerol es fuente viable para ser consumida por *Aspergillus niger*, sin embargo, no para la producción de ácido cítrico.**

RECOMENDACIONES

1. Realizar una pre-adaptación de *Aspergillus niger* en medio sólido rico en glicerol hasta una concentración 100% glicerol.
2. Evaluar los medios de cultivo hasta una duración de 10 días que es el tiempo en que de acuerdo a la cinética desarrollada (glicerol puro), iniciaron los mejores resultados para la producción de ácido cítrico.
3. Emplear las muestras crudas (sin metanol) evaluando el consumo de glicerol y de los ácidos grasos.
4. Utilizar las muestras crudas con diferentes porcentajes de remoción de metanol y evaluar como éste afecta o promueve la producción de ácido cítrico.
5. Mediante la manipulación de las cepas adicionales evaluar la producción de otros ácidos orgánicos en función del consumo de glicerol.
6. Determinar la producción de otros productos orgánicos como el ácido oxálico y el ácido isocítrico en los medios propuestos en esta investigación.

BIBLIOGRAFÍA

1. Abín L., Coto O., Marrero B. & Marrero J.. (2004). Estudio Fisiológico de la Producción de Ácido Cítrico por *Aspergillus niger* O-5. *CENIC Ciencias Biológicas*, 35(1), 15-18.
2. Acevedo J. & Hernández J.. (2015). Simulación a Escala Industrial de la Purificación de la Glicerina Cruda, Subproducto del Biodiesel de Palma. *Semana de Divulgación Científica Institucional* , 5.
3. Almeida J., Fávaro L. & Quirino B.. (2012). Biodiesel Biorefinery: Opportunities and Challenges For Microbial Production of Fuels and Chemicals From Glycerol Waste. *Biotechnology for biofuels*, 5, 48.
4. Arístegui J.. (2009). Los Biocombustibles desde la Perspectiva del Comercio Internacional y del Derecho de la Organización Mundial del Comercio. *Revista de Derecho*, 22(1), 113-134.
5. Betancourt C., de Mello R., Castellanos L. & Silva C.. (2016). Glycerin as Byproduct of Biodiesel Production, its Characteristics, Applications and Soil Use. *Cultivos Tropicales*, 37(3), 7-14.
6. Betiku E. & Adesina O.. (2013). Statistical Approach to the Optimization of Citric Acid Production Using Filamentous Fungus *Aspergillus niger* Grown on Sweet Potato Starch Hydrolyzate. *Biomass and Bioenergy*, 55, 350-354.
7. Cardeño F., Gallego L. & Ríos L.. (2011). Refinación de la Fase Glicerina del Biodiesel de Aceite de Palma Empleando Ácidos Minerales. *Información Tecnológica*, 22(6), 15-24.
8. Cardona C. A., Posada J. A. & Quintero J. A.. (2010). *Glicerol como Co-producto: Propiedades Fisicoquímicas, Características de Calidad y Estado Comercial*. En Aprovechamiento de Subproductos y Residuos Agroindustriales: Glicerina y Lignocelulósicos (218). Manizales, Caldas, Colombia: Universidad Nacional de Colombia. pp. 51-80.
9. Fakas S., Makri A., Bellou S. & Aggelis G., (2009). Pathways to Aerobic Glycerol Catabolism and their Regulation. En G. Aggelis. (Ed.), *Microbial Conversions of Raw Glycerol* (pp. 9-14). New York, E.U.: Nova Biomedical Books.

10. Ferrero A., Rosa I. & Veneciano E.. (2010). Proceso de Purificación de la Glicerina Obtenida del Biodiesel a Pequeña Escala. *Centro de Investigación en Tecnología Lactocárnica, Univerisdad Tecnológica Nacional*, 312(2), 97-106
11. Gómez J. R. & Cancino J. F.. (2011). Tesis: Caracterización de los Productos Obtenidos a Partir de la Fermentación de Glicerol Crudo con Microorganismos Nativos. *Centro de Estudios e Investigaciones Ambientales, Universidad Industrial de Santander*, 72.
12. Gómez A., Sánchez M. & Muñoz J.. (2014). Efecto del Fósforo y del Potasio en la Producción de Ácido Cítrico Utilizando una Cepa de *Aspergillus niger*. *Acta Agronomica*, 63(3), 222-228.
13. Hayder A., Mohamed D. & Zinah A-A.. (2012). Economic Benefit from the Optimization of Citric Acid Production from Rice Straw Through Plackett-Burman Design and Central Composite Design. *Turkish Journal of Engineering Enviromental Science*, 36 (1), 81-93.
14. Imandi S., Bandaru V., Somalanka S., Bandaru S. & Garapati H.. (2008). Application of Statistical Experimental Designs for the Optimization of Medium Constituents for the Production of Citric Acid from Pineapple Waste. *Bioresource Technology*, 99, 4445-4450.
15. Infante M., Aguirre S. & Danley A.. (1999). Estudios del Efecto in Vitro e in Vivo de Ciertos Metales Sobre la Actividad Isocitrato Deshidrogenasa de una Cepa de *Aspergillus wentii* Productora de Ácido Cítrico. *IV Congreso Latinoamericano de Biotecnología y Bioingeniería*.
16. Informe de la European Citric Acid Manufacturers Association (ECAMA). 2012.
17. Jaehoon C. & Young J.. (1991). Effect of Ammonium Ion Concentration and Application to Fed-batch Culture for Overproduction of Citric Acid. *Journal Fermentation Biotechnology*, 72, 106-109.
18. Juárez M. & Favela E.. (2015). Tesis: Fisiología de Crecimiento de *Aspergillus niger* en Fermentación en Medio Sólido con Diferentes Soportes. *Universidad Autónoma Metropolitana*, 23-25.
19. Karaffa L. & Kubicek C.. (2003). *Aspergillus niger* Citric Acid Accumulation: Do We Understand This Well Working Black Box?. *Appl Microbiol Biotechnol*, 61, 189-196.

20. Leal D., Pico Y., Castro J., Guerra J. & Castro G.. (2011). Producción de Ácido Cítrico a Partir de Suero Lácteo Entero e Hidrolizado con *Aspergillus niger*, por vía fermentativa. *Universidad de La Salle*, 1-7.
21. Lotfy W., Ghanem K. & El-Helow E.. (2007). Citric Acid Production by a Novel *Aspergillus niger* Isolate: I Mutagenesis and Cost Reduction Studies. *Bioresource Technology*, 98(18), 3464-3469.
22. Lotfy W., Ghanem K. & El-Helow E.. (2007). Citric Acid Production by a Novel *Aspergillus niger* Isolate: II. Optimization of Process Parameters Through Statistical Experimental Designs. *Bioresource Technology*, 98(18), 3470-3477.
23. Marier J. & Boulet M.. (1958). Direct Determination of Citric Acid in Milk with an Improved Pyridine-Acetic Anhydride Method. *Journal of Dairy Science*, 41 (12), 1683-1692.
24. Mesa L., Graterol E., Rodríguez S., Araujo K., Clamens C. & León G. (2007). Desarrollo de *Aspergillus niger* ATCC 11414 en un Sustrato con Base en la Goma de *Anacardium occidentale*. Producción de α -D-galactosidasa. *Kasmera*, 35(2), 146-155.
25. Montgomery D.. (2005). *Design and Analysis of Experiment*. England: John Wiley and Sons.
- Montoya D. & Aragón O.. (2010). Bioprocesos Aplicados a la Valorización del Glicerol Residual en la Producción de Biodiesel. *Palmas*, 31(2), 126-135.
26. Morales W., Polich N., Sequeira A., Chamorro E. & Herrero E.. (2010). Purificación de Glicerol Obtenido a Partir de Síntesis de Biodiesel de Aceite Crudo de Algodón. *Avances en Energías Renovables y Medio Ambiente*, 14, 25-30.
27. Muñoz A., Sáenz A., López L., Cantú J. & Barajas L.. (2014). Ácido Cítrico: Compuesto Interesante. *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*, 6(12), 18-23.
28. Musial I. & Rymowicz W. , (2009). Biodiesel By-Products Used as Substrates for Oxalic Acid Production by *Aspergillus niger*. En G. Aggelis. (Ed.), *Microbial Conversions of Raw Glycerol* (pp. 31-39). New York, E.U.: Nova Biomedical Books.
29. Oficina Matriz México. (2000-2017). *Precios de Glicerol*. Agosto 2017, de Quiminet.com. Recuperado de: <http://www.quiminet.com/productos/glicerol-1475726529/precios.htm>

30. Papagianni M. (2007). Review: Advances in Citric Acid Fermentation by *Aspergillus niger*: Biochemical Aspects, Membrane Transport and Modeling. *Biotechnology Advances*, 25, 244-263.
31. Papanikolaou S., Fakas S., Fick M., Chevalot I., Galiotou-Panayotou M., Komaitis M., Marc I. & Aggelis G.. (2008). Biotechnological Valorization of Raw Glycerol Discharged After Bio-diesel (Fatty Acid Methyl Esters) Manufacturing Process: Production of 1,3-Propanediol, Citric Acid and Single Cell Oil. *Biomass and Bioenergy*, 32, 60-71.
32. Pel J., Winde H., Archer D., Hofman G., Shcaap P., Turner G., Vries R.. *et al.* (2007). Genome Sequencing and Analysis of the Versatile Cell Factory *Aspergillus niger* CBS 523.88. *Nature Biotechnology*, 25(2), 221-231 [University of Groningen]*.
33. Pena A., Veiga S., Florencio C., Couto J., Spinelli N., Musso M. & Bussi J.. (s.f). Reformado Catalítico de Glicerina Residual de la Producción de Biodiesel. Laboratorio de Fisicoquímica de Superficies (LAFIDESU), Facultad de Química, UDELAR, 10.
34. Pérez G. & Guerra G.. (2014). Escalado del Tamaño de Pellet Obtenido en la Fermentación Sumergida de Sacarosa con *Aspergillus niger*, desde un Reactor de 2 l hasta uno de 14 l, con el Coeficiente KLA de Transferencia de Masa Constante. *Revista EPN*, 34(1).
35. Plackett R. & Burman, J.. (1946). The Design of Optimum Multifactorial Experiments. *Biometrika*, 33, 305-325.
36. Posada J. & Cardona C.. (2010). Análisis de la Refinación de Glicerina Obtenida como Coproducto en la Producción de Biodiesel. *Ingeniería y Universidad*, 14(1), 9-28.
37. Rymowicz, W., Rywinska, A., Zarowska B. & Juszczuk P. (2006). Citric Production From Raw Glycerol by Acetate Mutants of *Yarrowia lipolytica*. *Chemical Papers*, 60, 301-304.
38. Rywinska A. & Rymowicz W, (2009). Pathways to Aerobic Glycerol Catabolism and their Regulation. En G. Aggelis. (Ed.), *Microbial Conversions of Raw Glycerol* (pp. 19-28). New York, E.U.: Nova Biomedical Books.

39. Robles D. & Quesada J.. (2013). Purificación y Cuantificación de Glicerina Cruda y Adaptación del Método ASTM D6584 para la Determinación de Glicerina en Biodiesel. *Ciencia y Tecnología*, 29(2), 17-29.
40. Saavedra S., Porras O., Pacheco M., David A., Gutiérrez J. & Rangel D.. (2016). Comparación del Proceso de Purificación del Glicerol Crudo Usando Ácido Cítrico y Ácido Clorhídrico. *CITECSA*, 6(11), 60-68.
41. Sáez A., Flórez L. & Cadavid A.. (2002). Caracterización de una Cepa Nativa de *Aspergillus niger* y Evaluación de la Producción de Ácido Cítrico. *Revista Universidad EAFIT*, 128, 33-42.
42. Samragy Y., Khorshid M., Foda M. & Shehata A.. (1996). Effect of Fermentation Conditions on the Production of Citric Acid from Cheese Whey by *Aspergillus niger*. *International Journal of Food Microbiology*, 29, 411-416.
43. Sánchez J., Favela E. & Gutiérrez M.. (2010) Tesis: Efecto de la composición del medio de cultivo en el metabolismo de *Aspergillus niger* 10 en fermentación en estado sólido. *Universidad Autónoma Metropolitana de Iztapalapa*.
44. Santibáñez C., Varnero M. & Bustamante M.. (2011). Residual Glycerol From Biodiesel Manufacturing, Waste or Potential Source of Bioenergy: A Review. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 71(3), 469-475.
45. Shu P. & Johnson M.. (1948). The Interdependence of Medium Constituents in Citric Acid Production by Submerged Fermentation. *J. Bacteriol.* 54, 161-167.
46. Singh G., Kaur S., Verma M. & Dayal R.. (2011). Recent Advances in Citric Acid Bio-production and Recovery. *Food and Bioprocess Technology*, 4(4), 505-529.
47. Singh S. & Dikshit A.. (2010). Optimization of the Parameters for Decolourization by *Aspergillus niger* of Anaerobically Digested Distillery Spentwash Pretreated with Polyaluminium Chloride. *Journal of Hazardous Materials*, 176, 864-869.
48. Trade Map: Estadísticas del Comercio para el Desarrollo Internacional de las Empresas. (1999-2015). Genève, Suiza: Análisis e Investigación de Mercados, Centro de Comercio Internacional (ITC). Recuperado de: http://www.trademap.org/Product_SelCountry_TS.aspx?nvpm=3|484|||2918||6|1|1|1|2|1|1|2|1

49. Vandenberghe L., Soccol C., Pandey A. & Lebeault J-M.. (1999). REVIEW Microbial Production of Citric Acid. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 42(2), 263-276.
50. Velásquez J., Beltrán D., Padilla L. & Giraldo G.. (2010). Obtención de Ácido Cítrico por Fermentación con *Aspergillus niger* Utilizando Sustrato de Plátano Dominico Hartón maduro (musa aab simmonds).. *Tumbaga*, 5, 135-147.
51. Verhoff F. H. 2006. *Citric acid*. En Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry (5651-5656) United States: Electronic Release, Wiley-VCH, Weinheim, Miles Laboratories.
52. Vieira L, Pellegrini F. & Filomena P.. (2010). Tesis: La Producción de Ácido Cítrico con *Yarrowia Lipolytica* Utilizando Glicerol como Fuente de Carbono. Universidad Federal de Río de Janeiro.
53. Wen Z., Pyle D. J. & Athalye S. K., (2009). Glycerol Waste from Biodiesel Manufacturing. En G. Aggelis. (Ed.), *Microbial Conversions of Raw Glycerol* (pp. 1-5). New York, E.U.: Nova Biomedical Books.
54. Wieczorek S. & Brauer H.. (1998). Continuous Production of Citric Acid with Recirculation of the Fermentation Broth after Product Recovery. *Bioprocess Engineering*, 18, 1-5.
55. Yang F., Hanna M. & Sun R.. (2012). Value-added Uses for Crude Glycerol-a byproduct of Biodiesel Production. *Biotechnology for Biofuels*, 5(1), 13.

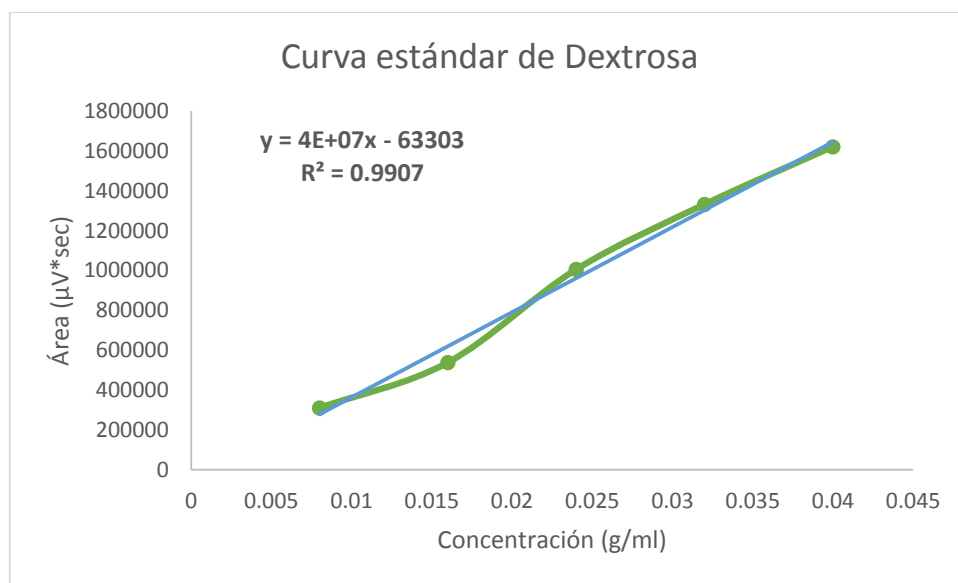
APÉNDICES

Curva de Calibración para la Determinación de Dextrosa y Glicerol

Se detallará el método en general para ambos reactivos, y finalmente se mostrarán las curvas resultantes y sus respectivos ajustes.

Se realizan soluciones conocidas para cada reactivo con agua destilada. Posteriormente son pasadas por microfiltros de 45 μm y depositadas en viales para su posterior lectura en el HPLC. Las lecturas en el equipo se realizan bajo las condiciones mencionadas en el apartado descrito en metodología. Obteniéndose las siguientes curvas.

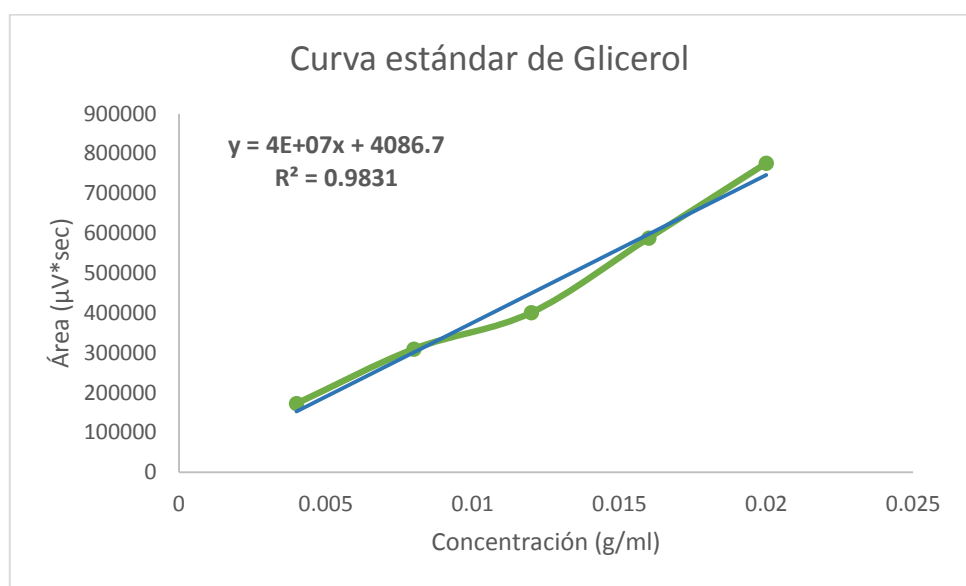
Dextrosa	Concentración (g/ml)	0.008	0.016	0.024	0.032	0.04
	Área ($\mu\text{V}\cdot\text{sec}$)	310326	538344	1005383	1332065	1621515



Con el ajuste tenemos la ecuación para determinar dextrosa la cuál es:

$$[Dextrosa] = \frac{\text{Área} + 63303}{4 \times 10^7}$$

Glicerol	Conc. (g/ml)	0.004	0.008	0.012	0.016	0.02
	Área (μV*sec)	172681	309833	401012	588282	775872



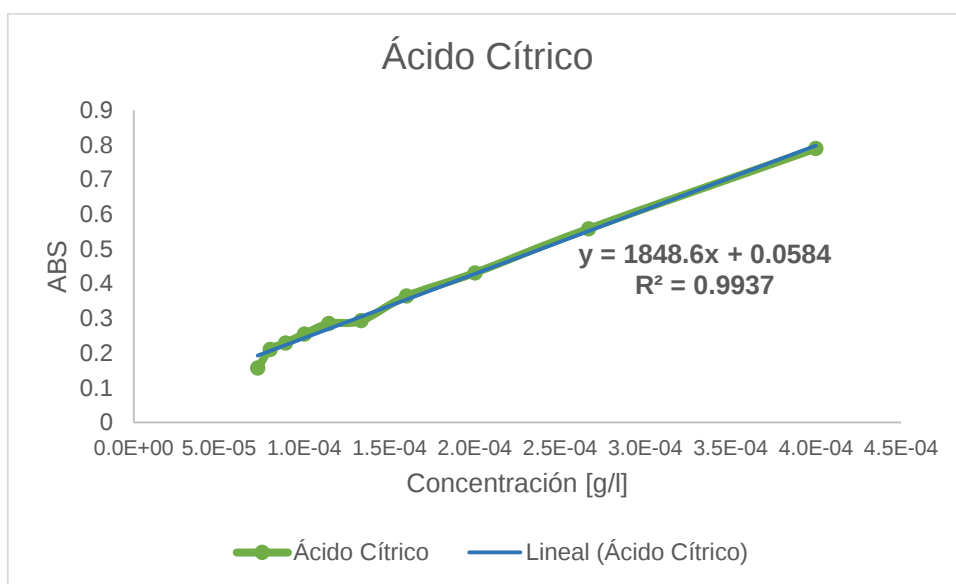
Con el ajuste tenemos la ecuación para determinar glicerol la cuál es:

$$[Glicerol] = \frac{\text{Área} - 4086.7}{4 \times 10^7}$$

Curva de Calibración para la Determinación de Ácido Cítrico

Se disuelven 0.02 g de ácido cítrico en 25 ml de agua destilada. Se realizan una serie de diluciones, tomando un ml del stock y diluyendo con agua destilada de 1 hasta 10 ml de agua destilada (en tubos independientes). De cada uno de los tubos con la solución diluida se toman un ml y se vierten en tubos de tapa rosca. Se adicionan 1.3 ml de piridina y se agita suavemente. Se adicionan 5.7 ml de anhídrido acético, agitando suavemente (reacción altamente exotérmica) y colocándose en baño maría a $32 \pm 0.5^\circ\text{C}$. Se dejan reposar por 10 min y se procede a tomarse las lecturas en el espectrofotómetro (Libra S12) a una longitud de onda de 420 nm.

[g/ml] Ácido Cítrico	7.27E-05	8.00E-05	8.89E-05	1.00E-04	1.14E-04	1.33E-04	1.60E-04	2.00E-04	2.67E-04	4.00E-04
ABS	0.157	0.21	0.229	0.255	0.285	0.293	0.364	0.431	0.558	0.789



Con el ajuste tenemos la ecuación para determinar ácido cítrico la cuál es:

$$[\text{Ácido Cítrico}] = \frac{ABS - 0.0584}{1848.6}$$